

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Příprava a charakterizace lidských buněčných  
kofaktorů retrovirové integrace**

**Preparation and characterization of human  
cellular cofactors of retroviral integration**

Diplomová práce

**Kateřina Čermáková**

Vedoucí práce: RNDr. Pavlína Řezáčová, Ph.D.

Laboratoř strukturní biologie ÚOCHB AV ČR, v.v.i.

PRAHA 2010

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky RNDr. Pavlíny Řezáčové, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne 30.4.2010

Podpis: .....

Kateřina Čermáková

## PODĚKOVÁNÍ:

Tato práce byla vypracována v Laboratoři strukturní biologie na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., jako součást řešení projektu THINC (Targeting HIV Integration Cofactors) financovaného Evropskou unií (7<sup>th</sup> Framework Program).

Tímto bych chtěla projevit dík všem, jejichž podpora a účast mi pomohly při studiu a při sepisování této práce.

Zvláště bych chtěla poděkovat vedoucí své diplomové práce RNDr. Pavlíně Řezáčové, Ph.D za vstřícný přístup, odborné a trpělivé vedení a za čas, který mi věnovala při přípravě a sepisování této práce.

Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Magdaleně Hořejší, Ing. Kateřině Procházkové, Ph.D, Ing. Ireně Sieglové a RNDr. Milanovi Fábrymu, CSc. za odborné rady, všestrannou pomoc a za zasvěcení do práce v laboratoři, Jitce Kredbové a Věře Mrkvičkové za cenné rady a ochotnou pomoc, Mgr. Pavlu Maderovi za pomoc v „boji“ s výpočetní technikou, a také Ing. Zdeňku Voburkovi za analýzu vzorků pomocí N-koncové sekvenace.

Celému kolektivu laboratoře strukturní biologie velice děkuji za vytvoření příjemného a přátelského pracovního prostředí.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině za pomoc a podporu během celého studia.

## ABSTRACT

Lens epithelium-derived growth factor/p75 (LEDGF/p75) is a prominent cellular binding partner of Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) integrase. It is a human nuclear protein, which has been implicated in transcriptional regulation and cell survival. The role of LEDGF/p75 in HIV integration is well characterized, the HIV integrase binding domain (IBD) was identified and structural studies, which provide detail information about this interaction, were done. However, very little is known about its physiological function. As a transcriptional co-activator, LEDGF/p75 is implicated not only in HIV replication, but also in human cancer and autoimmunity. Key feature for both, the viral and cellular role of this protein, is its ability to act as a molecular adaptor tethering proteins to the chromatin fiber.

Recently, PogZ (Pogo transposable element derived protein with zinc finger domain) was identified and validated as a new cellular interaction partner of LEDGF/p75. It was shown, that their interaction is mediated by IBD of LEDGF/p75 and the C-terminal domain of PogZ. To gain more insight in this interaction, we have initiated structural studies of their complex. Structural information is crucial for understanding the LEDGF/p75 biological role and might help in design of inhibitors selectively blocking interaction with HIV integrase while not interfering with the LEDGF/p75 biological function.

In this thesis, we set out to prepare the IBD of LEDGF/p75, a domain responsible for interaction with HIV integrase and also with PogZ. The IBD was cloned and expressed in *E. coli*. Various cloning, expression and purification strategies were investigated before the optimal protocol was established. The protein was isolated from the cytosol and purified with yields sufficient for binding studies. The binding of IBD toward PogZ was confirmed and experiments aiming at preparation of complex for crystallization have been initiated.

(In Czech)

# OBSAH

<b>1. SEZNAM ZKRATEK.....</b>	<b>7</b>
<b>2. ÚVOD.....</b>	<b>12</b>
<b>3. PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY .....</b>	<b>13</b>
3.1. LEDGF/p75 .....	13
3.1.1. Genová organizace a alternativní sestřih.....	14
3.1.2. Vazba na chromatin.....	16
3.1.3. Přirozená buněčná funkce LEDGF/p75.....	16
3.2. LEDGF/p75 jako kofaktor retrovirové integrace.....	18
3.2.1. HIV-1 integrasa.....	18
3.2.2. Začlenění LEDGF/p75 do procesu integrace .....	19
3.2.3. Struktura komplexu LEDGF/p75 a HIV-1 integrasy .....	20
3.3. Přirození vazební partneři LEDGF/p75 .....	23
3.3.1. PogZ.....	24
<b>4. CÍL .....</b>	<b>26</b>
<b>5. MATERIÁL A METODY.....</b>	<b>27</b>
5.1. Materiál.....	27
5.1.1. Chemikálie .....	27
5.1.2. Enzymy .....	30
5.1.3. Expresní plasmidy a bakteriální kmeny .....	30
5.1.4. Protilátky a syntetické oligonukleotidy .....	31
5.1.5. Použitá média a pufry.....	32
5.1.6. Ostatní materiál .....	35
5.1.7. Přístroje .....	36
5.2. Metody.....	38
5.2.1. Metody použité při práci s plasmidy a při klonování .....	38
5.2.1.1. Štěpení restrikčními endonukleasami .....	38
5.2.1.2. Polymerasová řetězová reakce.....	38
5.2.1.3. TOPO klonování.....	39
5.2.1.4. Transformace bakterií plasmidovou DNA.....	40
5.2.1.5. Minipreparace plasmidové DNA.....	40
5.2.2. Expres a izolace.....	41
5.2.2.1. Rekombinantní exprese .....	41
5.2.2.2. Izolace fuzního proteinu MBP-ctPogZ.....	42
5.2.2.3. Izolace a rozpouštění inkusních tělísek fuzního proteinu GST-IBD .....	42

5.2.2.4.	Izolace a rozpouštění inkusních tělísek proteinu 6×H-IBD .....	43
5.2.3.	Elektromigrační metody .....	44
5.2.3.1.	Horizontální agarosová elektroforéza .....	44
5.2.3.2.	Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za denaturujících podmínek .....	45
5.2.3.3.	Elektropřenos proteinů na membránu (Western Blot) .....	46
5.2.4.	Chromatografické metody .....	47
5.2.4.1.	Afinitní chromatografie fuzních proteinů .....	47
5.2.4.2.	Chelatační chromatografie .....	48
5.2.5.	Stanovení koncentrace proteinu měřením absorbance .....	49
5.2.6.	Dialýza a ultrafiltrace .....	49
5.2.7.	N-koncová sekvenace proteinů .....	49
5.2.8.	Ověření interakce proteinů vazbou komplexu na Ni-CAM HC nosiči (tzv. „Pull-down“ stanovení) .....	50
<b>6.</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>51</b>
6.1.	Konstrukty pro expresi ctPogZ .....	51
6.1.1.	Příprava MBP-ctPogZ .....	52
6.1.1.1.	Rekombinantní exprese a izolace fuzního proteinu MBP-ctPogZ .....	53
6.1.1.2.	Purifikace a štěpení MBP-ctPogZ .....	55
6.2.	Konstrukty pro expresi IBD .....	57
6.2.1.	Příprava fuzního proteinu GST-IBD .....	58
6.2.1.1.	Rekombinantní exprese a izolace GST-IBD .....	59
6.2.1.2.	Izolace GST-IBD z inkusních tělísek .....	61
6.2.1.3.	Purifikace a štěpení GST-IBD z buněčného lyzátu .....	63
6.2.2.	Příprava proteinu IBD bez fuzního partnera .....	64
6.2.2.1.	Rekombinantní exprese a izolace fuzního proteinu 6×H-IBD .....	65
6.2.2.2.	Příprava 6×H-IBD z inkusních tělísek .....	68
6.2.2.3.	Purifikace a štěpení 6×H-IBD z buněčného lyzátu .....	70
6.3.	Ověření vazebné aktivity IBD proteinu .....	73
<b>7.</b>	<b>DISKUSE .....</b>	<b>75</b>
<b>8.</b>	<b>SOUHRN .....</b>	<b>81</b>
<b>9.</b>	<b>POUŽITÁ LITERATURA .....</b>	<b>82</b>

## 1. SEZNAM ZKRATEK

6×H	histidinový hexapeptid (histidinová kotva)
6×H-IBD	fuzní protein sestávající z histidinové kotvy a IBD
A <sub>280nm</sub>	absorbance při vlnové délce 280 nm
A <sub>550nm</sub>	absorbance při vlnové délce 550 nm
AA	akrylamid
AIDS	Syndrom získaného selhání imunity (z angl. Acquired Immune Deficiency Syndrome)
AT smyčka	proteinová doména schopná interagovat s DNA v místech bohatých na adenin a thymin
AV ČR	Akademie věd České republiky
BamH I	restrikční endonukleasa pocházející z bakteriálního druhu <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
BIS	N,N'-methylen-bis(akrylamid)
BL21 (DE3)	kmen <i>E. coli</i> nesoucí profága λ DE3 s genem pro T7 RNA polymerasu používaný pro rekombinantní expresi
CCD	doména obsahující katalytické jádro enzymu (z angl. catalytic core domain)
CEMC7	buněčná linie odvozená od buněk lidské akutní T-lymfoblastické leukémie
Cdc7	kinasa regulující replikaci DNA v eukaryotních organismech (z angl. Cell division cycle 7)
Cdc7-ASK	aktivátor Cdc7 kinasy v S fázi buněčného cyklu (z angl. Cdc7-activator of S-phase kinase)
c-myc	protoonkoprotein regulující transkripci, buněčnou proliferaci, diferenciaci a apoptosu
CTD	C-koncová doména (z angl. C-terminal domain)
ctPogZ	C-koncový úsek proteinu PogZ
ctPogZ-6×H	protein sestávající z ctPogZ a histidinové kotvy

---

CR1, CR2, CR3	oblasti proteinu LEDGF/p75 nesoucí náboj (z angl. charged region 1, 2, 3)
DDE	doména obsahující funkčně uspořádané zbytky kyseliny asparagové a glutamové
DFS70	alternativní název LEDGF/p75 (z angl. Dense fine speckled antigen of 70 kDa)
DH5 $\alpha$	kmen <i>E. coli</i> používaný pro amplifikaci plasmidové DNA
EcoR I	restrikční endonukleasa pocházející z bakteriálního druhu <i>E. coli</i>
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EIAV	druh viru z čeledi <i>Retroviridae</i> (z angl. Equine Infectious Anaemia Virus)
endA1	mutace způsobující inaktivaci bakteriální endonukleasy I
ETG	ethyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid (analog IPTG)
FIV	druh viru z čeledi <i>Retroviridae</i> (z angl. Feline Immunodeficiency Virus)
GFP	zeleně fluoreskující protein (z angl. Green fluorescent protein)
GSH	glutathion (redukováná forma)
GST	glutathion-S-transferasová doména
GST-IBD	fuzní protein sestávající z GST a IBD
HDGF	rodina růstových faktorů (z angl. Hepadoma Derived Growth Factors)
HIV	druh viru z čeledi <i>Retroviridae</i> (z angl. Human Immunodeficiency Virus)
HIV-1	typ viru HIV
HPLC	druh kapalinové chromatografie (z angl. high performance (pressure) liquid chromatography)
HRP	proteinová rodina (z angl. HDGF related protein)
HTH	typ DNA vazebné domény (z angl. helix-turn-helix)
IBD	doména vázající integrasu virů z čeledi <i>Lentivireae</i> (z angl. integrase binding domain)



lon	cytoplasmatická proteasa z <i>E. coli</i>
IPTG	isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid
JPO-2	přirozený buněčný vazebný partner proteinu LEDGF/p75
LacI	represor (reprimující <i>lac</i> operátor)
<i>lac</i> operátor	operátor v <i>lac</i> operonu
LB	Luria-Bertani, typ média
MBP	protein vázající maltosu (z angl. maltose binding protein)
MBP-ctPogZ	fuzní protein sestávající z MBP a ctPogZ
MLL	typ leukémie (z angl. mixed lineage leukemia)
MVV	druh viru z čeledi <i>Retroviridae</i> (z angl. Maedi-Visna Virus)
Nde I	restrikční endonukleasa pocházející z bakteriálního druhu <i>Neisseria denitrificans</i>
Ni-CAM HC	nosič pro chelatační chromatografii (z angl. Nickel Chelate Affinity Matrix, High Capacity)
NLS	signální sekvence pro transport do jádra (z angl. nuclear localization signal)
Not I	restrikční endonukleasa pocházející z bakteriálního druhu <i>Nocardia otitidis</i>
NTD	N-koncová doména (z angl. N-terminal domain)
LEDGF	lidský jaderný protein (z angl. Lens epithelium-derived growth factor)
OmpT	membránová proteasa z <i>E. coli</i>
ot./min.	počet otáček za minutu
p52	protein o velikosti 52 kDa
p75	protein o velikosti 75 kDa
PBS	fyzilogický roztok pufovaný fosfátem (z angl. Phosphate Buffered Saline)
PC4	obecný transkripční koaktivátor (z angl. Positive cofactor 4)
PCR	polymerasová řetězová reakce (z angl. Polymerase Chain Reaction)

pET151/D-TOPO	plasmidový vektor umožňující exprimovat rekombinantní proteiny
pET 22b	plasmidový vektor umožňující exprimovat rekombinantní proteiny
pET IBD	plasmidový konstrukt pro expresi fuzního proteinu 6×H-IBD
pGEX 2TK	plasmidový vektor umožňující exprimovat rekombinantní proteiny ve fuzi s GST
pGEX IBD p75	plasmidový konstrukt pro expresi fuzního proteinu GST-IBD
Pfu polymerasa	DNA polymerasa izolovaná z kmene <i>Pyrococcus furiosus</i>
P <sub>lacUV5</sub>	typ <i>lac</i> promotoru
pMAL ctPogZ	plasmidový konstrukt pro expresi fuzního proteinu MBP-ctPogZ
pMAL p2x	plasmidový vektor umožňující exprimovat rekombinantní proteiny ve fuzi s MBP
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
PogZ	lidský buněčný protein (z angl. Pogo transposable element derived protein with zinc finger domain)
PSIP	název genu kódujícího LEDGF/p75 (z angl. PC4 and SRFS interacting protein)
PSIP1	alternativní název LEDGF/p75 (z angl. PC4 and SRFS interacting protein 1)
Pst I	restrikční endonukleasa pocházející z bakteriálního druhu <i>Providencia stuartii</i>
P <sub>tac</sub>	typ <i>tac</i> promotoru
PWWP doména	doména obsahující specificky funkčně uspořádané zbytky fenylalaninu a tryptofanu
R1	alternativní název proteinu JPO-2
RAM 2	alternativní název proteinu JPO-2
recA1	mutace bakteriálního genu <i>recA</i> zabraňující rekombinaci
Rosetta 2	kmen <i>E. coli</i> používaný pro rekombinantní expresi
SID	nejmenší oblast nutná k interakci (z angl. specific interaction domain)
SDS	dodecylsírán sodný

SDS - PAGE	diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za denaturujících podmínek
sp1	obecný transkripční faktor
SRFS	obecný sestřihový faktor
T7	druh bakteriofága
TAE	roztok obsahující Tris, acetát a EDTA
<i>tac</i>	druh promotoru odvozený od <i>lac</i> promotoru
TBS	fyziologický roztok pufovaný Tris (z angl. Tris Buffered Saline)
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TEV proteasa	proteasa izolovaná z rostlinného pathogenu (z angl. Tobacco Etch Virus)
TIGD	proteinová rodina (z angl. Tigger derived)
TOP10	kmen <i>E. coli</i> používaný pro amplifikaci plasmidové DNA
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
ÚOCHB	Ústav organické chemie a biochemie
V5	epitop odvozený od epitopu přítomného na P a V proteinech paramyxoviru Simian virus 5
v.v.i.	veřejná výzkumná instituce
v/v	objemová procenta
w/v	hmotnostní procenta
WB	příčný elektroforetický přenos proteinů z polyakrylamidového gelu na membránu (Western Blot)
ZNF doména	zinek vázající doména (z angl. zinc finger)

## 2. ÚVOD

Nemoc AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) vyvolaná virem HIV (Human Immunodeficiency Virus) stále představuje jeden z nejzávažnějších celosvětových problémů. Životní cyklus viru HIV je velice dobře prozkoumán a dodnes bylo vyvinuto velké množství inhibitorů HIV, které zasahují do různých kroků jeho replikačního cyklu. Během replikace však dochází k častým mutacím vedoucím k rozvoji resistance vůči existujícím virostatikům, což si vynucuje neustálý vývoj nových způsobů léčby.

Virus samotný má velice omezenou genomovou kapacitu a existuje tedy pouze malé množství jeho vlastních proteinů vhodných pro cílený zásah virostatiky. Během svého cyklu zneužívá aparát hostitelské buňky a ke své replikaci používá tzv. buněčné kofaktory. Právě interakce virových proteinů s buněčnými se dnes stávají novými cíly terapeutického zásahu. Buněčné kofaktory retrovirové replikace však také zastávají přirozenou úlohu v buněčných procesech, která nesmí být při případném zásahu do této interakce narušena. Proto je nezbytné studovat nejen funkci buněčných kofaktorů v replikaci viru, ale též jejich přirozenou úlohu.

Jedním z nově objevených a intenzivně studovaných kofaktorů retrovirové replikace je LEDGF/p75. Tento protein interaguje s integrasou viru HIV-1 a napomáhá při integraci virové DNA do genomu hostitelské buňky. Jeho přirozená role v buňce souvisí s regulací transkripce, buněčného přežití a s autoimunitou [1]. Dodnes byli odhaleni čtyři jeho přirození vazební partneři, jejichž vazba na LEDGF/p75 je zprostředkována stejnou doménou, jako vazba integrasy viru HIV-1; konkrétně se jedná o JPO-2 [2], PogZ [3], menin/MLL komplex [4] a Cdc7-ASK [5]. Vědecký výzkum neustále přináší nové poznatky umožňující pochopení komplexních mechanismů buněčných procesů, do nichž se LEDGF/p75 a jeho přirození buněční vazební partneři začleňují.

Tato práce byla vypracována v rámci mezinárodního projektu THINC (Targeting HIV Integration Co-factors), na jehož řešení se školící laboratoř podílí. Projekt je mimo jiné zacílen na vývoj inhibitorů, které by bránily vazbě integrasy viru HIV-1 na LEDGF/p75. Pro návrh inhibitorů s minimálními vedlejšími účinky je nezbytné získat informace o topologii vazebných míst a detailně prostudovat interakce LEDGF/p75 s jeho přirozenými vazebnými partnery.

### 3. PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

#### 3.1. LEDGF/p75

LEDGF/p75 je lidský buněčný protein sestávající z 530 aminokyselin. Jeho přirozená buněčná funkce nebyla dodnes zcela objasněna. Doposud bylo v literatuře popsáno, že zasahuje do regulace transkripce, buněčného přežití a autoimunity [1]. Do popředí zájmu se tento protein dostal zjištěním, že je zneužíván virem HIV během jeho replikace v hostitelské buňce [6].

Dvojitý název tohoto proteinu pochází ze dvou na sobě nezávislých studií. LEDGF je zkratkou anglického názvu „Lens epithelium-derived growth factor“. Tento protein byl izolován z genomové knihovny získané z epiteliálních buněk myši oční čočky (lens epithelium cells) [7] a byl zařazen do HDGF rodiny růstových faktorů (Hepadoma Derived Growth Factors). V jeho struktuře byla totiž predikována PWWP doména (tj. doména obsahující specificky funkčně uspořádané zbytky fenylalaninu a tryptofanu, tzv. PWWP motiv), která je pro tuto rodinu charakteristická [8]. Později však byl předpoklad, že se jedná o růstový faktor, vyvrácen. Bylo totiž zjištěno, že se jedná o jaderný protein, který je vázán na chromatin, a proto nemůže zprostředkovávat přenos signálu [9, 10]. Dnes je řazen do rodiny HRP (HDGF related protein).

Poprvé byl LEDGF/p75 izolován během purifikace obecného transkripčního koaktivátoru PC4 (Positive cofactor 4). Tento výzkum vedl k popsání neznámého proteinu, který migruje při denaturující elektroforéze v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) s přibližnou molekulovou hmotností 75 kDa. Odtud pochází druhá část jeho názvu-p75 [11]. Během tohoto výzkumu byl izolován i protein LEDGF/p52, jež je kódován stejným genem, a vzniká alternativním sestřihem [12]. Obě varianty proteinu LEDGF byly prokázány ve všech typech lidských buněk, jejich zastoupení v jednotlivých tkáních se však liší [11].

V literatuře je možné setkat se i s dalšími názvy tohoto proteinu; někdy je označován PSIP1 (PC4 and SRFS interacting protein 1), DFS70 (Dense fine speckled antigen of 70 kDA) a nebo transkripční koaktivátor p75 [1].

### 3.1.1. Genová organizace a alternativní sestřih

LEDGF/p75 i LEDGF/p52 jsou kódovány genem *PSIP* (PC4 and SF2 interacting protein). Vzájemná rozdílnost těchto proteinů je dána alternativním sestřihem. Gen je dlouhý 35,7 kb, je umístěn na lidském chromosomu 9p22.3 a skládá se z 15 exonů a 14 intronů [12]. Podrobnější informace o tom, jaké úseky těchto proteinů jsou kódovány jednotlivými exony se nacházejí v **Tabulce 1** (str.14).

**Tabulka 1: Genová organizace proteinů LEDGF/p75 a LEDGF/p52**

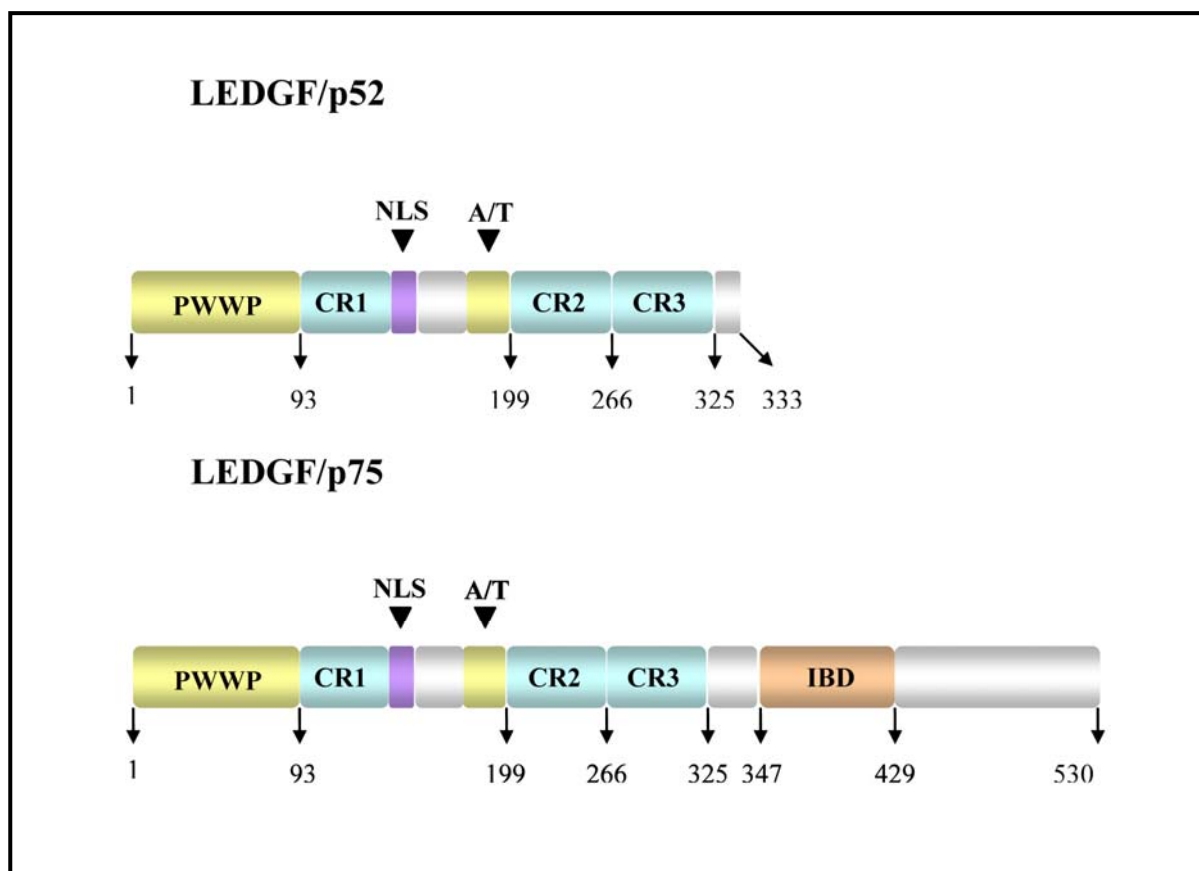
U jednotlivých exonů jsou uvedeny aminokyselinové zbytky a části domén proteinů LEDGF/p75 a LEDGF/p52, které daný exon kóduje. PWWP je doména obsahující PWWP motiv, AT je smyčka obsahující DNA vázající motiv, CR1, CR2 a CR3 jsou oblasti nesoucí náboj a NLS je jaderný lokalizační signál. Alternativa LEDGF/p75 vlastní navíc úsek obsahující IBD, což je doména vázající virovou integrasu [1].

Exon	LEDGF/p75		LEDGF/p52	
	Aminokyselinový zbytek	Doména proteinu	Aminokyselinový zbytek	Doména proteinu
<b>1</b>	1-23	PWWP	1-23	PWWP
<b>2</b>	24-50	PWWP	24-50	PWWP
<b>3</b>	51-96	PWWP,CR1	51-96	PWWP,CR1
<b>4</b>	97-131	CR1	97-131	CR1
<b>5</b>	136-152	CR1,NLS	136-152	CR1,NLS
<b>6</b>	153-184	NLS, AT	153-184	NLS, AT
<b>7</b>	185-210	AT, CR2	185-210	AT, CR2
<b>8</b>	211-286	CR2, CR3	211-286	CR2, CR3
<b>9</b>	287-325	CR3	287-325	CR3
<b>10</b>	326-347		326-333	
<b>11</b>	348-368	IBD	-	-
<b>12</b>	369-402	IBD	-	-
<b>13</b>	403-429	IBD	-	-
<b>14</b>	430-511		-	-
<b>15</b>	512-530		-	-

Obě varianty proteinu LEDGF mají společný N-koncový úsek. Jedná se o 326 aminokyselinových zbytků kódovaných exony 1-9. Tyto exony kódují doménu obsahující PWWP motiv (PWWP doména) a doménu schopnou interagovat s DNA v místech bohatých na adenin a thymin (AT smyčka), které jsou zodpovědné za vazbu na chromatin. Dále kódují nabitě oblasti CR1, CR2 a CR3 (charged region 1, 2 a 3), které také přispívají ke stabilitě interakce s chromatinem, a signální sekvenci NLS (nuclear localization

signal), která determinuje jadernou lokalizaci tohoto proteinu a zprostředkovává jeho přenos do jádra [13-15].

Na C konci má LEDGF/p75 za již zmíněným společným N-koncovým úsekem dalších 205 aminokyselinových zbytků, zatímco varianta p52 pouze 8. V této oblasti se u LEDGF/p75 nachází doména vázající virovou integrasu - IBD (integrase binding domain), která je zodpovědná za zapojení proteinu do replikačního cyklu viru HIV-1 (viz **Obrázek 1**, str. 15) [15, 16].



**Obrázek 1: Doménové uspořádání LEDGF/p75 a LEDGF/p52**

Na obrázku je schématicky znázorněn rozdíl v primární struktuře těchto proteinů. Oba proteiny jsou kódovány jedním genem; vznikají alternativním sestřihem. Mají společný N-koncový úsek, ve kterém se nachází doména obsahující PWWP motiv (PWWP), DNA vazebná doména (A/T), nabitě oblasti (CR1, CR2 a CR3) a signální sekvence determinující jadernou lokalizaci tohoto proteinu (NLS). Varianta LEDGF/p75 je o 197 aminokyselinových zbytků delší a obsahuje ve své struktuře navíc doménu vázající integrasu virů z rodu *Lentivireae* (IBD). Schéma bylo vytvořeno podle Llana M. et al. [1].

### 3.1.2. Vazba na chromatin

Jak již bylo výše zmíněno, LEDGF/p75 je jaderný protein, který se pevně váže na chromatin. Elementy rozhodující o jaderné lokalizaci LEDGF/p75, umožňující jeho vazbu na chromatin, se nacházejí v N-koncovém úseku tohoto proteinu. Jsou tedy přítomné u obou alternativních variant proteinu. Fakt, že se LEDGF/p75 i p52 vážou na chromatin během celého buněčného cyklu, byl prokázán prostřednictvím experimentů s GFP fuzním proteinem [17]. Jejich vazba na chromatin je velice pevná, přetrvává i po extrakci chromatinu v isotonickém pufru obsahujícím Triton-X [13]. Bylo dokázáno, že tato stabilita je zprostředkována především PWWP doménou, ale mají na ní vliv i ostatní domény tohoto proteinu; vazbu značně umocňuje AT smyčka a částečně přispívají i přilehlé CR1, CR2 a CR3 domény a NLS [13, 14].

Molekulární mechanismus vazby zatím nebyl přesně určen. Jedna studie ukazuje, že se PWWP doména váže přímo na DNA [18], podle jiné je však vazba LEDGF/p75 na DNA zprostředkovávána AT-smyčkou a NLS, a PWWP doména interaguje spíše s proteinovými komponentami chromatinu [14]. Pro objasnění způsobu vazby LEDGF/p75 je tedy nutné provést další studie.

Jaderná distribuce proteinů LEDGF/p52 a LEDGF/p75 se od sebe vzájemně liší; u obou je však závislá na stádiu buněčného cyklu [17]. Rozdíl v distribuci těchto dvou proteinů je pravděpodobně způsoben přítomností IBD v C-koncové části LEDGF/p75. Ten buď sám modifikuje interakce N-koncového úseku LEDGF s chromatinem, nebo je modifikují jiné jaderné proteiny, které se na IBD vážou [1].

Bylo též ukázáno, že LEDGF/p75 interaguje s dalšími proteiny [2, 4, 11, 19] a často jim slouží jako kotva, která je připojuje k chromatinu [13, 20, 21].

### 3.1.3. Přirozená buněčná funkce LEDGF/p75

Je jisté, že díky schopnosti vázat se na chromatin funguje LEDGF/p75 jako transkripční koaktivátor. Jak již bylo zmíněno, LEDGF/p75 byl původně identifikován po jeho kopurifikaci s transkripčním koaktivátorem PC4 a *in vitro* vykazoval aktivitu jako koaktivátor transkripce [11]. Některé experimenty ukazují, že LEDGF/p75 indukuje expresi endogenních proteinů prostřednictvím vlivu na promotory obsahující prvky



rozpoznávané při teplotním šoku a buněčném stresu (heat shock a stress related proteins) [22-25, 29, 30].

LEDGF/p75 působí pleiotropně na buněčné přežití a apoptosu. Bylo zjištěno, že při jeho přebytku dochází u různých druhů buněk ke zvýšení odolnosti vůči nutričnímu stresu, oxidativnímu poškození, teplotnímu šoku nebo působení UV záření [7, 26, 31-35]. Ochrana buňky je pravděpodobně zajišťována regulací transkripce genů, k jejichž přepisu běžně v jádře dochází při vystavení buňky stresu. To vede k syntéze některých antiapoptotických proteinů, jako je například heat shock protein 27 [7], heat shock protein 90 [33],  $\alpha$ -crystallin [33], antioxidantní protein 2A [24] a involucrin [25].

Na druhou stranu je LEDGF/p75 substrátem pro kaspasy. Během apoptosy je prostřednictvím kaspasy-3 a kaspasy-7 štěpen, což vede ke vzniku fragmentů, které na rozdíl od kompletního proteinu nemohou zasahovat do regulace transkripce a nedokáží tedy aktivovat ochranné systémy buňky. Dvě štěpící místa pro kaspasy se nacházejí v PWWP doméně (za aminokyselinovým zbytkem 30 a 85) a třetí se nachází na C-konci (za aminokyselinovým zbytkem 486) [35, 36].

Nedávno bylo zjištěno, že LEDGF/p75 hraje roli v zajišťování lysozomální integrity. Proto je studováno jeho působení na morfologii dalších buněčných systémů [37]. Tento protein je též funkčně začleněn do regulace transkripce genů souvisejících s ontogenesí a účastní se rozvoje myeloidní leukémie [4].

LEDGF/p75 je také spojován s autoimunitou, proto je někdy nazýván DFS70 (Dense fine speckled antigen of 70 kDa). Tento alternativní název vznikl, když bylo zjištěno, že je rozpoznáván autoprotilátkami přítomnými při několika chronických zánětlivých chorobách a rakovině [38-40]. Přítomnost těchto autoprotilátek však byla zjištěna i u některých jedinců, jenž nejsou postiženi ani jedním z těchto onemocnění [41]. Jejich zapojení do patogenese není jasné, nicméně se soudí, že se jedná o přirozené autoprotilátky, které jsou ve velkém množství produkovány v určitém stádiu těchto chorob.

Hledání epitopů na molekule LEDGF/p75 vedlo k závěru, že se autoprotilátky v 94% testovaných vzorků vážou na oblast mezi 349. a 435. aminokyselinovým zbytkem, což je úsek IBD [42]. Reaktivita s ostatními částmi LEDGF/p75 nebyla ve vyšší míře pozorována. To vede k závěru, že právě IBD je prvek začleňující tento protein do autoimunitních procesů [1].

### 3.2. LEDGF/p75 jako kofaktor retrovirové integrace

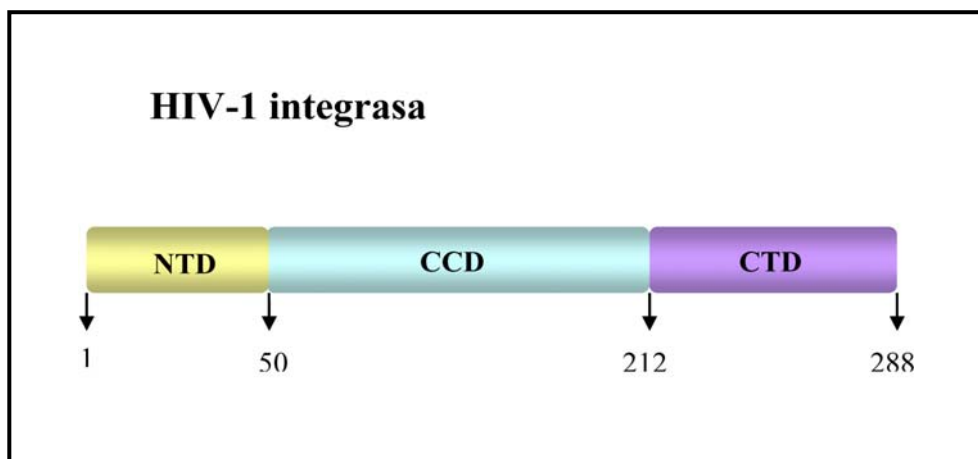
Jako kofaktor retrovirové replikace byl LEDGF/p75 odhalen spolu s několika dalšími proteiny prostřednictvím koimunoprecipitace jaderných komplexů s integrasou viru HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus type 1) [6]. Prostřednictvím kvasinkového dvouhybridního systému byla tato vazba potvrzena [43] a poté byla prokázána důležitost její role ve virovém replikačním cyklu [21, 44]. Jako doména rozpoznávající virovou integrasu byla identifikována IBD a prostřednictvím cílené mutagenese byly definovány minimální úseky nezbytné k interakci [45]. Další informace o vazbě přinesla rentgenostrukturní analýza kokryystalu interagující domény viru HIV-1 a IBD (viz kap. 4.4.3.) [46].

*In vitro* zvyšuje LEDGF/p75 enzymatickou aktivitu a rozpustnost HIV-1 integrasy [6, 16, 47]. IBD doména vykazuje výraznou mezidruhovou konzervovanost a bylo prokázáno, že LEDGF/p75 je zapojen do rozvoje dalších retrovirových infekcí. Kromě HIV-1 jsou buňky postrádající LEDGF/p75 resistantní například vůči FIV (Feline Immunodeficiency Virus) a EIAV (Equine Infectious Anaemia Virus). Bylo dokázáno, že se váže pouze na integrasy retrovirů pocházejících z čeledi *Lentiviridae* [1, 9, 44, 47, 48].

#### 3.2.1. HIV-1 integrasa

Integrasa viru HIV-1 je protein sestávající ze 288 aminokyselin. V genomu viru je HIV-1 kódována genem *pol* a je exprimována jako součást polyproteinového prekursoru Gag-Pol [49].

Integrasa se skládá ze tří rozličných domén (viz **Obrázek 2**, str. 19); CCD (catalytic core domain), jež je tvořena 51. - 212. aminokyselinovým zbytkem, obsahuje tři invariantní aminokyselinové zbytky kyselého charakteru, které jsou nezbytné pro katalytickou aktivitu proteinu. Jedná se o dva zbytky kyseliny asparagové (D64 a D116) a zbytek kyseliny glutamové (E152) (tzv. katalytická triáda), které koordinují bivalentní ionty [50]. N-koncová doména (zbytky 1-50) obsahuje motiv vázající zinek. C-koncová doména (zbytky 213-288) je v rámci retrovirů nejméně konzervovanou částí integrasy, vykazuje nespecifickou DNA vazebnou aktivitu [51].



**Obrázek 2: Doménové uspořádání integrasy viru HIV-1**

Na obrázku je schématicky znázorněna primární struktura HIV-1 integrasy. Skládá se celkem ze tří domén: CCD (catalytic core domain), NTD (N-terminal domain) a CTD (C-terminal domain). Katalytickou aktivitu zajišťuje CCD. NTD je schopna koordinovat zinečnaté ionty a CTD vykazuje DNA vazebnou aktivitu. Schéma bylo vytvořeno podle Asante-Appiah E. a Skalky A.M. [51].

Virová integrasa vstupuje do hostitelské buňky jako součást virové částice. Ta obsahuje přibližně 50-100 kopií tohoto proteinu. Její funkce je zásadní pro virovou replikaci, neboť katalyzuje včlenění virové DNA do některé z často přepisovaných transkripčních jednotek DNA hostitelské buňky. Proces virové integrace je ireversibilní. Integrasa se stala cílem pro vývoj léků proti AIDS. V klinické praxi je dnes k dispozici několik látek inhibujících funkci integrasy (např. raltegravir a elvitegravir) [52]. Jedná se o inhibitory procesu zvaného „strand transfer“ popsaného níže (viz kapitola 4.2.2.).

### **3.2.2. Začlenění LEDGF/p75 do procesu integrace**

HIV-1 integrasa má dvě základní enzymatické aktivity. V anglické literatuře se nazývají „3'-processing“ a „strand transfer“. Po reversní transkripci se integrasa váže na nově vzniklou lineární dvouvláknovou DNA, čímž vzniká preintegrační komplex. Pro její navázání je nezbytná vysoce konzervovaná sekvence CAGT nacházející se na 3' konci virové DNA. Poté dochází k odštěpení GT 3' koncového dinukleotidu. Tento proces se nazývá „3'-processing“ a odehrává se v cytoplasmě [53]. Výzkumy ukázaly, že k tomuto procesu dochází i u buněk postrádajících LEDGF/p75 [20].

Poté je preintegrační komplex přenesen do jádra, kde se odehrává proces zvaný „strand transfer“. Během něj je virová DNA zabudována do DNA hostitelské buňky. Volné 3' hydroxylové skupiny atakují fosfodiesterové vazby DNA hostitelské buňky, což vede ke vzniku dvou jednovláknových zlomů. Tyto zlomy vznikají každý na jednom z vláken DNA hostitelské buňky a jsou od sebe vzdálené 5 basí. Dojde tak ke vzniku dvou konců DNA, u nichž je u obou jedno z vláken vždy o 5 basí delší. Prostřednictvím „strand transferu“ a „3'-processingu“ jsou konce virové i hostitelské DNA upraveny tak, že jsou schopné spolu interagovat. Při narušení hostitelské DNA dochází k uvolnění energie, která je následně částečně použita k ligaci obou DNA [54]. Po včlenění virové DNA je proces integrace ukončen působením buněčných proteinů, které dosyntetizují chybějící nukleotidy a spojí volné konce vláken DNA.

Na rozdíl od „3'-processingu“ je „strand transfer“ ovlivňován přítomností LEDGF/p75. Bylo dokázáno, že vazba integrasy na LEDGF/p75 umožňuje asociaci preintegračního komplexu s chromatinem a že je pro virovou replikaci zásadní. Pokud se v buňce vyskytuje pouze LEDGF/p75, u nějž mutace způsobila neschopnost vázat se na chromatin nebo na virovou integrasu, pak je v těchto buňkách minimalizována schopnost replikace viru HIV-1. Kromě toho, že se LEDGF/p75 v jádře navazuje na preintegrační komplex a zprostředkovává jeho vazbu na chromatin, hraje také roli ve výběru místa integrace. Navádí virovou DNA do aktivně transkribovaných oblastí chromatinu, čímž zajišťuje častý přepis této genetické informace. To podporuje i fakt, že u LEDGF/p75 deficientních buněk je odlišná distribuce integrované virové DNA v rámci hostitelské DNA [55-57].

### **3.2.3. Struktura komplexu LEDGF/p75 a HIV-1 integrasy**

Pro racionální návrh léčiva zaměřeného na blokování vazby mezi LEDGF/p75 a integrasou viru HIV-1 je velice důležitá přesná charakterizace této vazby. Zatím byla vyřešena pouze struktura celé integrasy [58], struktura celého LEDGF/p75 je zatím neznámá. Byly však vytvořeny dva kokrystaly interagujících domén těchto proteinů. Konkrétně se jedná o kokrystal CCD integrasy viru HIV-1 (50. - 212. aminokyselinový zbytek s mutací F185K, která neovlivňuje vazbu a zvyšuje rozpustnost CCD) a IBD proteinu LEDGF/p75 (347. - 442. aminokyselinový zbytek) [46]. Dalším studovaným kokrystalem je kokrystal CCD a NTD domény (1. – 219. aminokyselinový zbytek)

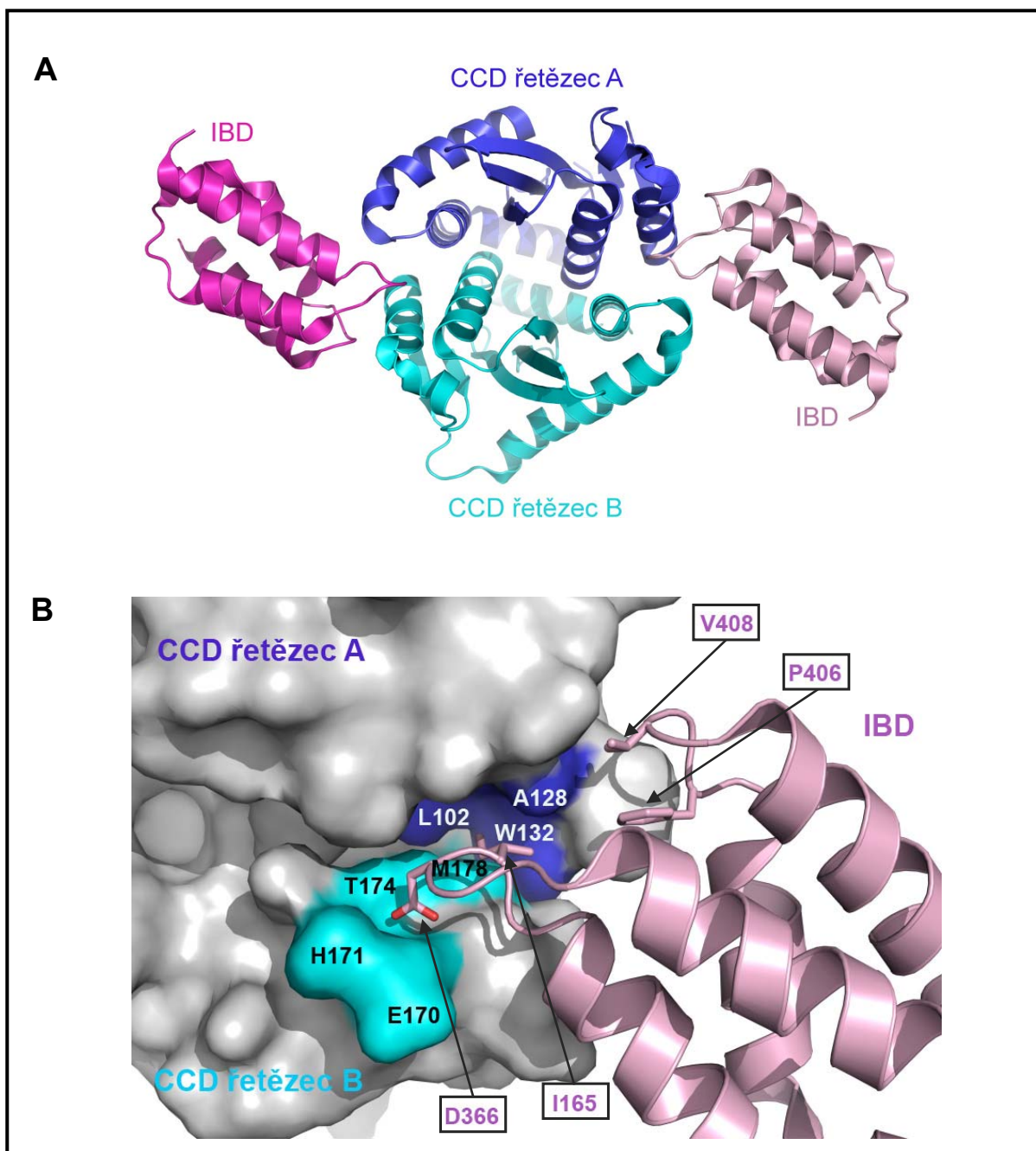
integrasy viru MVV (Maedi-visna virus) a IBD (347. - 442. aminokyselinový zbytek) [59]. Díky těmto strukturám jsou známy aminokyselinové zbytky umožňující interakci těchto dvou domén.

Asymetrická jednotka kokystalu CCD integrasy viru HIV-1 a IBD obsahuje dva monomery IBD interagující s dimerem CCD. U IBD je interagující částí smyčka mezi dvěma helixy. Tato smyčka se váže do hydrofobní kapsy nacházející se na dimerním rozhraní CCD domén (viz **Obrázek 3**, str. 22) [46].

Interakce se účastní velké množství aminokyselinových zbytků. Ukázalo se však, že pro vazbu IBD a CCD jsou klíčové tři zbytky molekuly IBD - I365, D366 a F406. Pokud dojde k jejich mutaci, pak se vazba mezi IBD a CCD neuskuteční. Při mutaci V408 IBD dochází prokazatelně ke snížení schopnosti vytvářet tuto vazbu. Vliv mutace ostatních zbytků IBD podílejících se přímo na interakci s CCD nebyl prokázán [60].

I365 se váže do již zmíněné hydrofobní kapsy tvořené zbytky L102, A128, A129 a W132 jedné molekuly CCD (řetězec A) a T174 a M178 druhé molekuly CCD (řetězec B). Zbytky IBD P406 a V408 jsou v kontaktu s A128 řetězce A CCD. Zbytek D366 IBD se účastní dvou vodíkových vazeb, interaguje se zbytky E170 a H171 řetězce B CCD (viz **Obrázek 3**, str. 22) [46].

Strukturní informace o vazbě integrasy viru HIV-1 a LEDGF/p75 vedly ke snaze vytvořit nízkomolekulární inhibitor, který by zapadl do hydrofobní kapsy integrasy a způsobil by změnu v topologii vazebného místa podobnou těm, které byly pozorovány u výše zmíněných mutantů [61].



**Obrázek 3: Struktura CCD domény integrasy viru HIV-1 ve vazbě s IBD doménou proteinu LEDGF/p75**

**A:** V asymetrické jednotce krystalu, ze kterého byla struktura vyřešena, se nachází dva monomery IBD (znázorněny v odstínech růžové) interagující s dimerem CCD (znázorněn v odstínech modré).

**B:** U IBD jsou pro interakci zásadní aminokyselinové zbytky P406, D366, I165 a V408. Vážou se do hydrofobní kapsy nacházející se na dimerním rozhraní CCD domén. Kapsa je tvořena zbytky A128, W132, L102 řetězce A a T174, M178, H171, E170 řetězce B dimeru [46].

Obrázek byl vytvořen v PyMOL [62] s použitím krystalové struktury 2B4J získané z databáze Protein Data Bank [63].

### 3.3. Přirození vazební partneři LEDGF/p75

Poté, co bylo potvrzeno, že LEDGF/p75 interaguje s integrasou viru HIV-1, se tento protein dostal do popředí zájmu. Kromě toho že začala být studována jeho přirozená buněčná funkce, začalo se pátrat po jeho přirozených buněčných vazebných partnerech.

Na rozdíl od LEDGF/p52, který funkčně interaguje s velkým množstvím různých virových transkripčních aktivátorů a začleňuje se tak do řízení transkripce jako koaktivátor, se LEDGF/p75 do těchto procesů zapojuje pouze zřídka, a to i přes podobnost obou proteinů (N-koncová sekvence LEDGF/p75 se z 97,6% shoduje se sekvencí LEDGF/p52) [17]. Nativní LEDGF/p75 některé tyto aktivátory nerozpoznává pravděpodobně proto, že jsou vazebná místa na N-koncovém úseku stéricky odstíněna C-koncovým úsekem nebo některými proteiny interagujícími s IBD [11].

Obzvláště důležitý je výzkum týkající se vazebných partnerů, jejichž interakce s LEDGF/p75 je zprostředkována doménou IBD. Doposud byli odhaleni čtyři takoví přirození buněční vazební partneři; konkrétně se jedná o JPO-2 [2], PogZ [3], menin/MLL komplex [4] a Cdc7-ASK [5]. Cílená mutagenese ukázala, že aminokyselinové zbytky podílející se na interakci IBD s dosud nalezenými vazebnými partnery, se vzájemně liší.

Cdc7-ASK (Cdc7-activator of S-phase kinase) je aktivátor kinasy, která hraje významnou roli v S fázi buněčného cyklu. Bylo zjištěno, že je schopna *in vitro* fosforylovat postranní řetězec serinu (S206) proteinu LEDFG/p75. Při odstranění C-koncového úseku Cdc7-ASK, který se účastní interakce s IBD, dochází k nadměrnému zvýšení funkce Cdc7 kinasy. Je tedy možné, že svou vazbou na Cdc7-ASK inhibuje LEDGF/p75 enzymatickou funkci tohoto proteinu. Tento objev je recentní a zatím nejsou známy další informace [5].

Menin a histon metyltransferasa MLL (mixed lineage leukemia) jsou proteiny, které jsou spojovány s několika druhy agresivní akutní leukémie [64, 65]. Bylo prokázáno, že LEDGF/p75 s těmito proteiny interaguje, váže se na komplex menin/MLL a ukotvuje jej k chromatinu. Vytvoření takového celku je nezbytné pro rozvoj zmíněných onemocnění.

JPO-2 je také znám pod názvy RAM2, R1 nebo Myc-interactor protein a c-Myc binding protein. Zatím u něj byla potvrzena a blíže popsána pouze jedna jeho přirozená funkce: jako represor se účastní regulace transkripce genu pro monoamin oxidasu A [66]. JPO-2 byl jako vazebný partner identifikován prostřednictvím kvasinkového

dvouhybridního systému. Jako „návnada“ byl použit C-koncový úsek LEDGF/p75 a cDNA knihovna získaná z lidských T-buněk jako „kořist“ [2, 19].

LEDGF/p75 chrání JPO-2 před proteolýzou a stabilizuje jej. Upevňuje tento protein k chromatinu během celého replikačního cyklu [2]. JPO-2 interaguje s LEDGF/p75 prostřednictvím SID (specific interaction domain), která je tvořena 62. – 94. aminokyselinovým zbytkem tohoto proteinu. Cílená mutagenese ukázala, že pro vazbu JPO-2 jsou klíčové jiné aminokyselinové zbytky IBD než pro vazbu virové integrasy [19]. Přesto byla při zvýšené produkci JPO-2 v buňkách pozorována malá, ale patrná inhibice replikace viru HIV-1 [19].

### 3.3.1. PogZ

Název proteinu PogZ je odvozen z anglického „Pogo transposable element derived protein with zinc finger domain“. Jedná se o protein, sestávající ze 1410 aminokyselinových zbytků. Jeho přirozená buněčná funkce zatím nebyla nalezena [3]. Poprvé byl objeven jako potenciální vazebný partner transkripčního faktoru sp1 [67]. Jako vazebný partner LEDGF/p75 byl identifikován později prostřednictvím kvasinkového dvouhybridního systému, při němž byl „návnadou“ C-koncový úsek LEDGF/p75 (431. - 507. aminokyselinový zbytek) a jako „kořist“ byla použita cDNA knihovna získaná z lidských T-buněk CEMC7 [3].

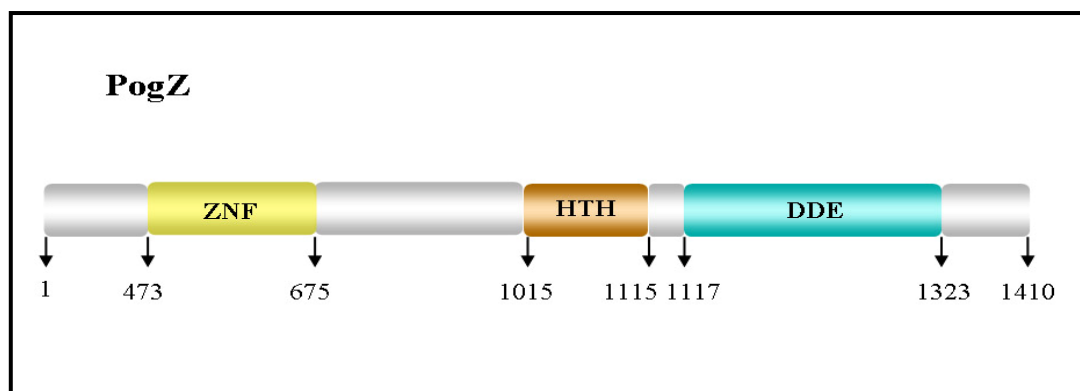
Pomocí sekvenční analýzy byly v jeho struktuře identifikovány (predikovány) celkem tři funkční domény. V N-koncové oblasti se nachází zinek vázající doména (473. - 675. aminokyselinový zbytek) a v C-koncové oblasti pak DNA vazebný HTH (helix-turn-helix) motiv tvořený 1015. - 1114. aminokyselinovým zbytkem a DDE doména (doména obsahující DDE motiv) tvořená 1117. - 1323. aminokyselinovým zbytkem (viz **Obrázek 4**, str. 25) [68-70].

DDE doména je charakteristická tím, že obsahuje dva zbytky kyseliny asparagové a jeden zbytek kyseliny glutamové nebo tři zbytky kyseliny asparagové specificky uspořádané ke koordinaci  $Mg^{2+}$  iontu a katalyzuje reakce spojené s modifikací DNA, jako je například štěpení vlákna DNA nebo ligace. Díky přítomnosti této domény se PogZ řadí do skupiny zdomácnělých TIGD (Tigger derived) DNA-transposas [69].

Úsek interagující s LEDGF/p75 (SID) se nachází na C-koncovém úseku PogZ a je celý součástí DDE domény. Konkrétně se jedná o aminokyselinové zbytky 1139 - 1248 [3].



Bylo zjištěno, že DDE doména je součástí integras všech virů z čeledi *Lentivirae*. Integrasa viru HIV-1 interaguje s IBD také prostřednictvím DDE domény, která je součástí CCD [71].



**Obrázek 4: Doménové uspořádání proteinu PogZ**

Na obrázku je schématicky znázorněna primární struktura proteinu PogZ. Ve své struktuře obsahuje tento protein doménu vázající  $\text{Zn}^{2+}$  inoty (ZNF), DNA vazebný „helix-turn-helix“ motiv (HTH) a doménu obsahující DDE motiv (DDE), která katalyzuje reakce spojené s modifikací DNA. Schéma bylo vytvořeno podle Bartholomeeusen K. et al. [51].

Cílená mutagenese ukázala, že aminokyselinové zbytky zapojené do vazby PogZ na IBD s těmi, které jsou nutné pro vazbu virové integrasy, částečně korelují. Kompetiční *in vitro* experimenty potvrdily, že virová integrasa vytěsňuje PogZ z IBD. Tento fakt by mohl být velice nepříznivý pro vývoj nového retrovirostatika zacíleného proti interakci LEDGF/p75 a integrasy viru HIV-1 [3].

PogZ stejně jako JPO-2, MLL/menin komplex a virová integrasa využívá vazby na LEDGF/p75 k ukotvení na chromatin. Na rozdíl od nich však tvoří komplex pouze s kondenzovaným chromatinem; asociuje s ním jen během interfáze a ne během mitosy. Tento rozdíl může být způsoben buď menší afinitou PogZ k LEDGF/p75, nebo kompeticí vazby nějakým jiným vazebným partnerem [3].

Určení buněčných úloh a přesnější charakterizace vzájemné interakce LEDGF/p75 a jeho přirozených vazebných partnerů jsou zcela nezbytné, aby při případné inhibici vazby LEDGF/p75 na integrasu nedošlo k narušení některé z přirozených buněčných funkcí.

## 4. CÍL

Tato práce je součástí dlouhodobého projektu řešeného ve školící laboratoři, který je zaměřen na studium interakce proteinu LEDGF/p75 s jeho přirozenými buněčnými vazebnými partnery. Cílem celého projektu je připravit LEDGF/p75 a jeho dva přirozené vazebné partnery JPO-2 a PogZ (nebo minimální úseky nezbytné pro vzájemnou vazbu těchto proteinů). Poté proteiny a jejich vzájemné interakce charakterizovat a připravit krystaly JPO-2 a PogZ, jejichž struktury ještě nebyly vyřešeny, a jejich kokrystaly s LEDGF/p75.

Cíle této diplomové práce byly následující:

- sepsání literární rešerše zabývající se vlastnostmi, strukturou a funkcí proteinu LEDGF/p75 se zvláštním zaměřením na jeho přirozenou buněčnou funkci a na jeho úlohu v replikačním cyklu virů rodu *Lentivirae*
- příprava proteinu ctPogZ z fuzního proteinu MBP-ctPogZ: optimalizace rekombinantní exprese, purifikace MBP-ctPogZ a následného odštěpení MBP pomocí Factoru Xa
- příprava LEDGF/p75 vazebné domény IBD z fuzního proteinu GST-IBD: optimalizace rekombinantní exprese, purifikace GST-IBD a následného odštěpení GST pomocí trombinu
- v případě neúspěchu v předchozím bodě, příprava alternativního plasmidového konstruktu pET IBD a příprava 6×H-IBD proteinu: optimalizace rekombinantní exprese, purifikace 6×H-IBD a následného odštěpení histidinové kotvy pomocí TEV proteasy
- nalezení podmínek vhodných pro vazbu námi připravených rekombinantních IBD a ctPogZ a ověření jejich vazebné afinity

## 5. MATERIÁL A METODY

### 5.1. Materiál

#### 5.1.1. Chemikálie

2-merkapt ethanol	Sigma-Aldrich, USA
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	Invitrogen, USA
agarosa	Biorad, Česká republika
akrylamid	Fluka, Švýcarsko
ampicilin	Biotika, Slovenská republika
BIS-TRIS	Serva, Německo
Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva, Německo
D(+)-Maltosa (monohydrát)	Lachema, Česká republika
Deoxycholát sodný (DOC)	Lachema, Česká republika
D-glukosa	Sigma-Aldrich, USA
D-Glukosa monohydrát	Lachema, Česká republika
Dimetylsulfoxid (DMSO)	Lachema, Česká republika
dodecylsírán sodný (SDS)	Sigma-Aldrich, USA
dusičnan stříbrný; AgNO <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich, USA
ethanol	Penta, Česká republika
ethidium bromid	Serva, Německo
ethylendiamin tetraoctová kyselina (EDTA)	Lachema, Česká republika
ethyl-β-D-thiogalaktosid (ETG)	laskavě poskytl Jan Ježek, ÚOCHB AV ČR, v.v.i.

fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roche, Švýcarsko
formaldehyd	Lachema, Česká republika
glukosa	Penta, Česká republika
glutathion (GSH-redukovaná forma)	Sigma-Aldrich, USA
glycerol	Penta, Česká republika
glycin	Sigma-Aldrich, USA
guanidin hydrochlorid	Lachema, Česká republika
HEPES	Sigma-Aldrich, USA
hovězí sérový albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, USA
hydroxid sodný; NaOH	Lachema, Česká republika
hydroxid vápenatý (dihydrát); $\text{Ca}(\text{OH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Lachema, Česká republika
chlorid hořečnatý (dodekahydrát); $\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Lachema, Česká republika
chlorid sodný; NaCl	Lachema, Česká republika
chloroform	Lachema, Česká republika
imidazol	Fluka, Švýcarsko
kyselina boritá; $\text{H}_3\text{BO}_3$	Sigma-Aldrich, USA
kyselina chlorovodíková; HCl	Lachema, Česká republika
kyselina octová; $\text{CH}_3\text{COOH}$	Lachema, Česká republika
kyselina sírová; $\text{H}_2\text{SO}_4$	Lachema, Česká republika
Laktino	PML, Česká republika
L-chloramfenikol	Biotika, Slovenská republika

methanol	Penta, Česká republika
močovina	Sigma-Aldrich, USA
N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, USA
N,N'-methylen-bis(akrylamid) (BIS)	Fluka, Švýcarsko
octan sodný (trihydrát); $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	Lachema, Česká republika
odtučněné sušené mléko	Eligo, Česká republika
persíran amonný	Sigma-Aldrich, USA
ponceau S	Sigma-Aldrich, USA
sacharosa	Serva, Německo
SDS	Sigma-Aldrich, USA
siřičitan sodný; $\text{Na}_2\text{SO}_3$	Lachema, Česká republika
thiosíran sodný; $\text{Na}_2\text{S}_3\text{O}_3$	Sigma-Aldrich, USA
tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich, USA
Triton X 100	Merck, Česká republika
Tween 20	Sigma-Aldrich, USA
uhličitan sodný; $\text{Na}_2\text{CO}_3$	Penta, Česká republika
xylén cyanová modř	Sigma-Aldrich, USA

### 5.1.2. Enzymy

**Polymerasy:** Pfu DNA polymerasa (MBI Fermentas, Kanada)

**Restrikční endonukleasy:** EcoR I (New England Biolabs, USA), BamH I (New England Biolabs, USA), Not I (New England Biolabs, USA), Nde I (New England Biolabs, USA)

**Hydrolasy:** RNasa A (Quiagen, Německo), lysozym chlorid (Sigma-Aldrich, USA), Factor Xa (New England Biolabs, USA), trombin (GE Healthcare Biosciences, Velká Británie), TEV proteasa (rekombinantně připravovaná ve školící laboratoři)

### 5.1.3. Expresní plasmidy a bakteriální kmeny

***Escherichia coli* BL21 (DE3)** (New England BioLabs, Velká Británie): *E. coli* s DE3 profágem  $\lambda$ , nesoucím gen T7 RNA polymerasy pod transkripční kontrolou promotoru  $P_{lacUV5}$ ; postrádá membránovou proteasu OmpT a cytoplasmatickou proteasu lon; je uzpůsoben k expresi rekombinantních proteinů

***Escherichia coli* Rosetta 2** (Novagen, Německo): *E. coli* BL21 bez DE3 profága, postrádá membránovou proteasu OmpT a cytoplasmatickou proteasu lon; obsahuje molekuly tRNA pro 7 kodónů, které se v *E. coli* vyskytují vzácně, přítomnost těchto tRNA zvyšuje hladinu exprese; geny tRNA jsou na kompatibilním plasmidu nesoucím resistenci na chloramfenikol; je uzpůsoben k expresi rekombinantních proteinů

***Escherichia* DH5 $\alpha$**  (Invitrogen, USA): kmen vhodný pro amplifikaci plasmidu, nese endA1 mutaci, díky níž je inaktivována endonukleasa I, což vede ke zvýšené stabilitě plasmidové DNA, a recA1 mutaci, která zabraňuje rekombinaci (což samotným buňkám neschází, nicméně to minimalizuje vznik delecí a multimerizaci plasmidů)

***Escherichia coli* TOP10** (Invitrogen, USA): kmen vhodný pro amplifikaci plasmidové DNA při klonování; stejně tak jako výše popsaný kmen DH5 $\alpha$  nese endA1 a recA1 mutace, které umožňují efektivní amplifikaci plasmidové DNA

***pGEX 2TK*** (GE Healthcare Biosciences, Velká Británie): plasmidový vektor umožňující exprimovat rekombinantní proteiny ve fuzi s glutathion-S-transferasovou doménou (GST), sloužící k afinitní purifikaci produktu na koloně s imobilizovaným glutathionem; exprese je řízena inducibilním systémem pod kontrolou *tac* promotoru  $P_{tac}$ ; základní exprese je minimalizována vazbou LacI represoru, na *lac* operátor, který se v plasmidu nachází za („downstream“) promotorem; selekčním markerem je resistance na ampicilin

***pMAL p2x*** (New England Biolabs, USA): plasmidový vektor umožňující exprimovat rekombinantní proteiny ve fuzi s proteinem vázajícím maltosu (MBP), sloužící k afinitní purifikaci produktu na koloně s imobilizovanou amylosou; exprese je řízena inducibilním systémem pod kontrolou *tac* promotoru  $P_{tac}$ ; základní exprese je minimalizována vazbou LacI represoru na *lac* operátor, který se nachází za („downstream“) promotorem; selekčním markerem je resistance na ampicilin

***pET151/D-TOPO***<sup>®</sup> (Invitrogen, USA): plasmidový vektor umožňující exprimovat rekombinantní proteiny ve fuzi s histidinovou kotvou (6×H) a V5 epitopem na N konci, za nimi je začleněno štepné místo pro TEV proteasu; díky histidinové kotvě je umožněna následná purifikace proteinu pomocí chelatační chromatografie na niklové koloně; exprese je řízena inducibilním systémem pod kontrolou *T7* promotoru (pocházejícího z fága T7) a je minimalizována vazbou LacI represoru na *lac* operátor, který se nachází za („downstream“) promotorem; selekčním markerem je resistance na ampicilin

#### **5.1.4. Protilátky a syntetické oligonukleotidy**

***Anti-His G-HRP Antibody*** (Invitrogen, USA): myší monoklonální protilátka IgG2a specificky rozpoznávající aminokyselinovou sekvenci 6×H–G, konjugovaná s křenovou peroxidasou

***K1 - sense primer*** (zakázkově připraven v Sigma-Aldrich, USA):

5' - CACCATGGATTCTCGACTTCA - 3'

***K2 - antisense primer*** (zakázkově připraven v Sigma-Aldrich, USA):

5' - CGATGAATTCTAAACCAAGA - 3'

### 5.1.5. Použitá média a pufry

#### TRANSFORMACE PLASMIDOVOU DNA A REKOMBINANTNÍ EXPRESE

**LB (*Luria-Bertani*) médium:** 10 mg/ml Bacto Trypton (Difco, USA); 5 mg/ml Yeast Extract (Difco, USA); 5 mg/ml chlorid sodný; pH 7,4 (nastaveno Tris basí)

**LB agar:** LB médium, agar (Difco, USA) (15 mg/ml), selekční marker (ampicilin (0,1 mg/ml) nebo chloramfenikol (0,1mg/ml) podle druhu používaných bakterií a plasmidů) a 1% glukosa.

#### MINIPREPARACE PLASMIDOVÉ DNA

**P1, P2, N3, PB a PE – pufry:** dodávány v komerční sadě „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (QIAGEN)

#### IZOLACE ROZPUSTNÉHO PROTEINU MBP-ctPogZ

**Lyzační pufr:** 50mM Tris-HCl, pH 8,0; 50mM NaCl, 5mM EDTA

**Promývací pufr:** 50mM Tris-HCl, pH 8,0; 50mM NaCl, 5mM EDTA

#### IZOLACE A ROZPOUŠTĚNÍ INKLUSNÍCH TĚLÍSEK PROTEINU GST-IBD

**Lyzační pufr:** 50mM Tris-HCl, pH 7,2; 500mM NaCl, 1mM EDTA, 5mM DTT

**Promývací pufr:** 20mM Tris-HCl, pH 7,2; 200mM NaCl, 2mM EDTA

**Rozpouštěcí pufr:** 50mM Tris-HCl, pH 7,2; 8M močovina, 150mM NaCl

#### IZOLACE A ROZPOUŠTĚNÍ INKLUSNÍCH TĚLÍSEK PROTEINU 6×H-IBD

**Lyzační pufr:** 50mM Tris-HCl, pH 7,8; 150mM NaCl

**Promývací pufr:** 50mM Tris-HCl, pH 7,8; 150mM NaCl

**Rozpouštěcí pufr:** 50mM Tris-HCl, pH 7,8; 8M močovina, 150mM NaCl



## HORIZONTÁLNÍ AGAROSOVÁ ELEKTROFORÉZA

**1× TAE pufr:** 40mM Tris-HCl, pH 8,0; 20mM CH<sub>3</sub>COOH; 1,12mM EDTA;

**Vzorkový pufr:** 0,25% (w/v) bromfenolová modř, 0,25% (w/v) xylen cyanolová modř, 30% (v/v) glycerol

## DISKONTINUÁLNÍ ELEKTROFORÉZA V POLYAKRYLAMIDOVÉM GELU ZA DENATURUJÍCÍCH PODMÍNEK

**Elektrodový pufr:** 20mM Tris-HCl, pH 8,3; 200mM glycin, 0,1% (w/v) SDS

**Vzorkový pufr:** 125mM Tris pH 6,8; 20% (v/v) glycerol; 4% (w/v) SDS; 0,2% (v/v) bromfenolová modř; v případě potřeby redukujících podmínek přidán 10% (v/v) 2-merkaptoethanol

## BARVENÍ STŘÍBREM

**Fixační roztok:** 12% (v/v) CH<sub>3</sub>COOH, 50% (v/v) methanol, 0,05% (v/v) formaldehyd

**Barvicí roztok:** 12mM AgNO<sub>3</sub>, 0,075% (v/v) formaldehyd

**Vyvolávací roztok:** 570mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,05% (v/v) formaldehyd, 16μM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

## SUŠENÍ GELŮ

**Sušicí roztok:** 20% ethanol a 3% glycerol

## WESTERN BLOT

**Elektrodový pufr:** 20mM Tris-HCl, pH 8,3; 200mM glycin; 0,1% (w/v) SDS a 20% (v/v) methanol

**10×TBS pufr:** 50mM Tris-HCl, pH 7,6; 150mM NaCl

**Blokovací pufr:** 50mM Tris-HCl, pH 7,6; 150mM NaCl, 3% (w/v) BSA, 0,1% (v/v) Tween 20

### **AFINITNÍ CHROMATOGRAFIE NA AMYLOSOVÉM NOSIČI**

**Ekvilibrační pufr:** 100mM Tris-HCl, pH 7,4; 200mM NaCl, 1mM EDTA

**Eluční pufr:** 100mM Tris-HCl, pH 7,4; 200mM NaCl, 1mM EDTA, 10mM maltosa

### **AFINITNÍ CHROMATOGRAFIE NA GLUTATHION SEPHAROSE**

**Ekvilibrační pufr:** 50mM Tris-HCl, pH 7,8; 150mM NaCl; v případě renaturace proteinu na koloně obsahoval ekvilibrační pufr navíc 800mM močovinu

**Eluční pufr:** 50mM Tris-HCl, pH 7,8; 150mM NaCl, 100mM glutathion (redukovaná forma - GSH)

### **CHELATAČNÍ CHROMATOGRAFIE NA Ni-CAM HC NOSIČI**

**Ekvilibrační pufr:** 50mM Tris-HCl, pH 7,8; 150mM NaCl ; v případě renaturace proteinu na koloně obsahoval ekvilibrační pufr navíc 8M močovinu

**Eluční pufr:** 50mM Tris-HCl, pH 7,8; 150mM NaCl, 250mM imidazol

### **N-KONCOVÁ SEKVENACE PROTEINŮ**

**Odbarvovací roztok:** 45% (v/v) methanol, 10% (v/v) CH<sub>3</sub>COOH

### **OVĚŘENÍ INTERAKCE PROTEINŮ VAZBOU KOMPLEXU NA Ni-CAM HC NOSIČI - „PULL-DOWN“ STANOVENÍ**

**Ekvilibrační pufr:** 50mM Tris-HCl, pH 7,8; 150mM NaCl

**Eluční pufr:** 50mM Tris-HCl, pH 7,8; 150mM NaCl, 250mM imidazol

### **5.1.6. Ostatní materiál**

- koncentrátoři Microcon nebo Amicon Ultra (Millipore, USA)
- chromatografický nosič Ni-CAM HC Resin (Sigma-Aldrich, USA)
- chromatografický nosič Amylose Resin (New England Biolabs, USA)
- chromatografický nosič Glutathion Sepharose (GE Healthcare Biosciences, Velká Británie)
- dialyzační membrána (Sigma-Aldrich, USA) celulosová, mezní velikost 10 kDa a 3 kDa
- přírodní celofán na sušení gelů po SDS-PAGE (Pemar, Česká republika)
- nitrocelulosová membrána pro příčný elektroforetický přenos proteinů z polyakrylamidového gelu na membránu (dále WB) Hybond-C Extra (Amersham Biosciences, Velká Británie)
- PVDF membrána pro WB (Sigma-Aldrich, USA)
- filtrační papír pro WB (Sigma-Aldrich, USA)
- jednorázové filtry Puradisc TM 25PP, póry 0,2  $\mu\text{m}$  (Whatman, Velká Británie)
- standard molekulových hmotností pro SDS-PAGE Broad range (Bio-Rad, USA)
- standard molekulových hmotností pro WB „Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder“ (MBI Fermentas, Kanada)
- standard molekulových hmotností pro agarosovou elektroforézu „Gene Ruler DNA Ladder Mix“ (MBI Fermentas, Kanada)

**5.1.7. Přístroje**

centrifugy	EBA 12R, rotor 1412 (Hettich Zentrifugen, Německo) Mini Spin (Eppendorf, Německo) Z 323 K (Hermle, Německo) RC-3B, rotor H 4000 (Sorvall Instruments, USA) Heraeus Multifuge 3S-R (Thermo Electron Corporation, Německo) J-21M, rotory JA-14, JA-21 (Beckman , USA)
spektrofotometry	Ultrospec 3100 <i>pro</i> UV/Visible Spectrophotometer (Amersham Biosciences, Velká Británie) NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA)
souprava pro elektroforézu	Mighty Small II SE 250 (Hoefer Scientific Instruments, USA) zdroj EV243 (Consort, Belgie) souprava pro horizontální agarosovou elektroforézu (vývojové dílny ČSAV, Česká republika)
souprava pro WB přenos	ISS-Enprotech (The W.E.P. Company, USA) zdroj EV243 (Consort, Belgie)
rotační inkubátory	INR-401 (Gallenkamp, Velká Británie) G25 (New brunswick scientific CO, USA) Orbital Incubator (Sanyo, Japonsko)
fázově kontrastní mikroskop	Carl Zeiss (Jena, Německo)
optický mikroskop	TMS (Nikon, Japonsko)
laminární box	BSB 4A Gelair Flow Laboratories, Austrálie
termostaty	TCH 100 (Laboratorní přístroje Praha, Česká republika) Sanyo CO2 Incubator MCO-ATAI, Japonsko
předvážky	PRS 620-3 (Kern, Německo) Adventur TM Pro AV2102CM (Ohaus, USA)
váhy	Owa labor (VEB Wägetechnik Rapido, Německo) Adventur TM Pro AV213CM (Ohaus, USA)
pH metr	GMH 3530 (Greisinger Electronic, Německo)
sonikátory	Soniprep 150 MSE (Sanyo, Velká Británie) Sonic Dismembrator (Dynatech, Francie)
třepačka	Rotamax 120 (Heidolph Instruments, Německo)

PCR	PCR cycler Progene (Techne, USA)
transluminátor	(Vibert-Lourmat, Francie)
flow box	BSB 4A (Gelaide, Austrálie)
fotoaparát	Sp500 uz (Olympus, Japonsko)
vodní lázeň	GRANT (P-lab, Česká republika)
vortex	MS2 Minishaker (Schoeller instruments, Česká republika) vortex (vývojové dílny ČSAV, Česká republika)
magnetická míchačka	Jenway 1000 (Hotplate and Stirrer, Velká Británie)
hluboko-mrazicí box	Snijders (Scientific, Nizozemsko)
centrifugační koncentrátor	Speed Vac Concentrator Savant (Thermo Scientific, USA)

## 5.2. Metody

### 5.2.1. Metody použité při práci s plasmidy a při klonování

#### 5.2.1.1. Štěpení restrikčními endonukleasami

Restrikční endonukleasy typu II jsou enzymy schopné rozpoznávat čtyři až šest nukleotidů dlouhé palindromické sekvence DNA a poté v těchto úsecích specificky DNA štěpit [72]. Pro svojí specifitu jsou hojně využívány k přípravě vektorů a insertů při molekulárním klonování a při restrikční analýze plasmidové DNA.

Štěpení DNA restrikčními endonukleasami vždy probíhalo za podmínek doporučených výrobcí, používané pufrы byly voleny dle pokynů výrobce. Pro analytické účely bylo štěpení restrikčními endonukleasami prováděno v celkovém objemu reakční směsi 10 µl 1 hodinu při 37 °C. Směs obsahovala 50 – 100 ng DNA, 1 µl příslušného pufru (dodáván vždy 10× koncentrovaný) a 0,5 - 1 µl enzymu (5-10 U). Po štěpení byly vzorky analyzovány pomocí horizontální agarosové elektroforézy (viz kap.5.2.3.2.).

#### 5.2.1.2. Polymerasová řetězová reakce

Polymerasová řetězová reakce (PCR) je metoda, která slouží k amplifikaci DNA. V připravené reakční směsi dochází k *in vitro* replikaci úseku DNA vymezeného primery [73]. Tato metoda byla využita k přípravě insertů pro TOPO klonování [74].

Primery použité při PCR reakci byly navrženy tak, aby docházelo k amplifikaci úseku DNA kódujícího část proteinu LEDGF/p57 obsahujícího IBD.

#### Použité primery:

*K1 - sense primer: 5' - CACCATGGATTCTCGACTTCA - 3'*

*K2 - antisense primer: 5' - CGATGAATTCTAAACCAAGA - 3'*

Polymerasová řetězová reakce (PCR) byla provedena podle pokynů výrobce Pfu DNA polymerasy (MBI Fermentas) [75]. Reakční směs obsahovala:

Reakční směs:

templátová DNA:	10 ng
<i>sense</i> primer (20μM):	1 μl
<i>antisense</i> primer (20μM):	1 μl
směs deoxyribonukleotidtrifosfátů (10mM každý):	1 μl
Pfu-pufr (10×koncentrovaný):	5 μl
Pfu DNA polymerasa (2,5 U/μl):	0,5 μl
HPLC-H <sub>2</sub> O:	do 50 μl

Připravená reakční směs byla přenesena do PCR cycleru Progene, který byl naprogramován následujícím způsobem:

Podmínky reakce:

1. iniciační denaturace:	95 °C / 3 min
2. denaturace:	94 °C / 40 s
3. hybridizace primerů:	54 °C / 30 s
4. polymerace DNA:	72 °C / 30 s
5. dokončení polymerace:	72 °C / 7 min

Kroky (2) až (4) byly provedeny celkově ve 35 cyklech. Produkty PCR byly analyzovány na horizontální agarosové elektroforéze (viz kap.5.2.3.2.).

**5.2.1.3. TOPO klonování**

TOPO klonování využívá enzymu topoisomerasy I kovalentně vázaného na koncích vektoru (není potřeba DNA ligasy pro zabudování insertu). Pro TOPO klonování byla využita komerční sada „TOPO<sup>®</sup> Cloning“ (Invitrogen), během celého procesu byly dodržovány pokyny výrobce [76].

V mikrozkmavce byly smíchány 2 μl insertu DNA (produkt PCR (viz kap. 5.2.1.2)), 1 μl roztoku solí (200mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>), 1 μl pET151/D-TOPO<sup>®</sup> vektoru a 2 μl vody. Vzniklý roztok byl ponechán 15 minut při pokojové teplotě, čímž došlo ke spojení plasmidu s vektorem. Poté byly 3 μl této směsi přeneseny ke kompetentním buňkám (One shot TOP10 competent cells). Reakce byla inkubována 30 minut na ledu a poté následoval teplotní šok (42 °C, 45 s) na vodní lázni, následně 2 minuty na ledu a po něm byly buňky zaočkovány do 900 μl LB média bez ampicilinu a byly umístěny do rotačního inkubátoru G25, kde byly inkubovány 1 hodinu při 37 °C za stálého třepání (180 ot./min). Po inkubaci byla suspence buněk nanášena na dvě Petriho misky (na jednu 100 a na druhou 500 μl

suspense) s LB agarom a ampicilinem. Misky byly ponechány v inkubátoru přes noc při 37 °C.

#### 5.2.1.4. Transformace bakterií plasmidovou DNA

Příslušnou plasmidovou DNA byly metodou tepotního šoku transformovány kompetentní buňky druhu *E.coli* [77]. Při transformaci bylo smícháno 100 µl bakteriální suspensione ( $A_{550nm}$  kolem 0,2) s 1 µl plasmidové DNA. Tato směs byla nejdříve inkubována postupně 30 min na ledu, 45 s ve vodní lázni při 42 °C a 2 min na ledu a poté jí bylo zaočkováno 900 µl LB média bez přidaných antibiotik. Vzniklá suspensione byla ponechána 1 hodinu při 37 °C za stálého třepání (180 ot./min).

Poté byla bakteriální suspensione rozetřena na LB agarových plotnách obsahujících ampicilin (100 µg/ml) a 1% glukosu, v případě použití bakteriálního kmene *Escherichia coli* Rosetta 2 také chloramfenikol (0,1 mg/ml). Na plotnu o průměru 20 cm obsahující 150 ml agaru bylo vždy rozetřeno 300 µl bakteriální suspensione a na plotnu o průměru 9 cm obsahující 25 ml agaru vždy 100 µl bakteriální suspensione. Plotny byly ponechány přes noc při teplotě 37 °C.

#### 5.2.1.5. Minipreparace plasmidové DNA

K minipreparaci plasmidové DNA byl používán komerční kit „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (QIAGEN). Byl dodržován postup doporučený výrobcem [78].

Plasmidová DNA byla transformována do příslušných kompetentních buněk výše popsanou metodou tepotního šoku (viz kap.5.2.1.5.). Vybraná kolonie z Petriho misky byla přenesena do 1,5 ml LB media s ampicilinem (o koncentraci 100 µg/ml) a ponechána přes noc při 37 °C v rotačním inkubátoru G25; rychlost třepání byla nastavena na 220 ot./min.

Bakteriální kultura byla centrifugována (9700×g, 2 min, laboratorní teplota, Mini Spin), supernatant byl důkladně odstraněn a peleta obsahující bakteriální buňky byla resuspendována ve 250 µl P1-pufu s přidanou RNAsou A (o koncentraci 100 µg/ml). Vzniklá suspensione byla přenesena do mikrozkušavky, ke vzorku bylo přidáno 250 µl P2-pufu a směs byla promíchána převrácením zkumavky. Nakonec bylo přidáno 350 µl N3-pufu, ihned po přidání byl roztok promíchán převrácením zkumavky a poté



centrifugován (11500×g, 10 min, laboratorní teplota, Mini Spin). Supernatant byl opatrně odebrán a aplikován na QIAprep-kolonku, která byla centrifugována (11500×g, 1 min, laboratorní teplota, Mini Spin), promyta 500 µl PB-pufu, centrifugována (11500×g, 1 min, laboratorní teplota, Mini Spin), dále promyta 750 µl PE-pufu a dvakrát centrifugována (11500×g, 1 min, laboratorní teplota, Mini Spin). DNA byla z kolonky eluována 50 µl sterilní vody.

Po minipreparaci byly získané vzorky analyzovány horizontální agarosovou elektroforézou (viz kap.5.2.3.2.).

## **5.2.2. Expresa a izolace**

### **5.2.2.1. Rekombinantní exprese**

Plasmidová DNA byla transformována (viz kap. 5.2.1.4.) do příslušných kompetentních buněk *E.coli*. Následující den byly kolonie z Petriho misek smyty LB médiem (z každé plotny 2×5 ml), k němuž byl přidán ampicilin (do výsledné koncentrace 100 µg/ml) a 0,4% (v/v) glycerol, čímž bylo získáno inokulum. U inokula bylo na spektrofotometru Ultrospec 3100*pro* změřena  $A_{550nm}$ . Následně bylo inokulum použito k zaočkování vždy 500 ml LB média (ve 2 l Erlenmeyerových baňkách) obsahující 0,4% (v/v) glycerol a ampicilin (o výsledné koncentraci 100 µg/ml). V některých případech (v závislosti na typu použitých buněk) obsahovalo LB médium též přídavek chloramfenikolu (o výsledné koncentraci 100 µg/ml). Výsledná  $A_{550nm}$  startovní kultury se pohybovala kolem 0,1.

Bakteriální kultury byly inkubovány v rotačním inkubátoru Gallenkamp nebo Sanyo při teplotě 20, 30 nebo 37 °C a 200 ot./min. Během kultivace byla každou hodinu měřena  $A_{550nm}$ . Po dosažení hodnoty  $A_{550nm}$  kolem 0,8 pro kultivaci při 20 a 30 °C a 1,5 pro kultivaci při 37 °C byla provedena indukce exprese přídavkem ETG do finální koncentrace 0,25 - 1 mmol/l. Bakteriální kultury byly dále pěstovány za stejných podmínek dalších 3 - 5 hodin (v závislosti na rychlosti růstu sledované měřením  $A_{550nm}$ ). Biomasa byla oddělena centrifugací (5000×g, 25 min, 4 °C, Sorvall RC-3B) a pelety byly zmrazeny. Tento protokol byl během práce pro jednotlivé plasmidy optimalizován.

Stanovení akumulace rekombinantního proteinu v inklusních těliscích bylo prováděno pozorováním vzorků odebraných během kultivace pomocí optického fázově kontrastního mikroskopu Carl Weiss [79, 80].

#### **5.2.2.2. Izolace fuzního proteinu MBP-ctPogZ**

Biomasa získaná rekombinantní expresí (viz kap. 5.2.2.1.) byla resuspendována v lyzačním pufru, na každý gram bakteriální biomasy bylo přidáno 10 ml pufru. K němu byl přidán inhibitor serinových proteas PMSF (do výsledné koncentrace 100  $\mu\text{mol/l}$ ). Suspence byla třikrát zmražena a rozmražena, čímž došlo k rozbití bakteriálních stěn.

Po posledním rozmražení byl přidán lysozym (finální koncentrace 1% (w/v)), sloužící k narušení peptidoglykanů buněčné stěny a směs byla inkubována 30 minut při teplotě 37 °C za stálého míchání na vodní lázni. Poté byl přidán deoxycholát sodný (detergent používaný na rozrušení buněčných membrán) tak, aby finální koncentrace byla 0,05% (w/v), a směs byla dále ponechána inkubovat 20 minut v ledové lázni za stálého míchání. Bakteriální lyzát byl za intenzivního chlazení sonikován 5×30 sekund sonikátorem Dynatech Sonic Dismembrator nastaveným na 60% výkon. Cytosol byl oddělen od nerozpustných zbytků buněk centrifugací (19800×g, 20 minut, 4 °C, Beckmann J-21M) [80].

#### **5.2.2.3. Izolace a rozpouštění inklusních tělísek fuzního proteinu GST-IBD**

Při rekombinantní expresi proteinů často dochází k tvorbě nerozpustných cytoplasmatických útvarů, tzv. inklusních tělísek. K ukládání rekombinantního proteinu do inklusních tělísek může docházet z mnoha různých důvodů. Příčinou může být například toxicita rekombinantního proteinu pro bakteriální metabolismus nebo nepřítomnost vhodného chaperonu.

Zastoupení rekombinantního proteinu v inklusních těliscích bývá velice významné. Výhodou tvorby proteinu ve formě inklusních tělísek je, že jsou tato tělíska snadno oddělitelná od bakteriálního cytosolu. Nevýhodou je, že je vznikající protein agregovaný a musí být renaturován, přičemž může dojít ke špatnému poskládání proteinu. Inklusní tělíska se obvykle rozpouštějí vysokými koncentracemi močoviny nebo guanidin hydrochloridu [81].

Biomasa získaná rekombinantní expresí (viz kap. 5.2.2.1.) byla resuspendována v lyzačním pufru, na každý gram bakteriální biomasy bylo přidáno 10 ml pufru. K němu byl přidán inhibitor serinových proteas PMSF (do výsledné koncentrace 100  $\mu\text{mol/l}$ ). Suspense byla třikrát zmrazena a rozmrazena, čímž došlo k rozbití bakteriálních stěn.

Po posledním rozmrazení byl přidán lysozym (finální koncentrace 1% (w/v)), sloužící k narušení peptidoglykanů buněčné stěny a směs byla inkubována 30 minut při teplotě 37 °C za stálého míchání na vodní lázni. Bakteriální lyzát byl za intenzivního chlazení sonikován 5×30 sekund sonikátorem Dynatech Sonic Dismembrator nastaveným na 60% výkon. Inkluse uvolněné z lyzovaných buněk byly odděleny centrifugací (19800×g, 20 minut, 4 °C, Beckmann J-21M). Supernatant (buněčný lyzát) byl uschován pro další analýzu.

Sediment byl následně omyt promývacím pufrem, ke kterému byl přidán Triton X-100 (do výsledné koncentrace 0,05% (v/v)), resuspendován sonikací a znovu centrifugován (19800×g, 20 minut, 4 °C, Beckmann J-21M nebo Hermle Z 323 K). Vzniklá peleta byla vždy 2 - 3× omyta promývacím pufrem bez Tritonu X-100; přitom byl dodržen stejný postup jako v předchozím případě [80, 82, 83].

Získané inkluse byly rozpouštěny v prostředí 8M močoviny. Byly resuspendovány v rozpouštěcím pufru (10 ml pufru na 1 g inkusí) a za intenzivního chlazení sonikovány 2×30 sekund. Poté byly ponechány rozpouštět po dobu 12 hodin. Nerozpouštěné části byly odděleny centrifugací (19800×g, 20 minut, 4 °C, Beckmann J-21M). Supernatant byl poté 2× naředěn a dále 5× naředěn takže výsledná koncentrace močoviny byla 800mM. Takto připravený roztok bylo možné rovnou použít k purifikaci na Glutathion Sepharose.

#### **5.2.2.4. Izolace a rozpouštění inklusních tělísek proteinu 6×H-IBD**

Biomasa získaná rekombinantní expresí (viz kap. 5.2.2.1.) byla resuspendována v lyzačním pufru, na každý gram bakteriální biomasy bylo přidáno 10 ml pufru. K němu byl přidán inhibitor serinových proteas PMSF (do výsledné koncentrace 100  $\mu\text{mol/l}$ ). Suspense byla třikrát zmrazena a rozmrazena, čímž došlo k rozbití bakteriálních stěn.

Bakteriální lyzát byl za intenzivního chlazení sonikován 5×30 sekund sonikátorem Dynatech Sonic Dismembrator nastaveným na 60% výkon. Inkluse uvolněné z lyzovaných buněk byly odděleny centrifugací (19800×g, 20 minut, 4 °C, Beckmann J-21M).

Supernatant (buněčný lyzát) byl uschován pro další analýzu a peleta (inkluse) byla dále zpracovávána.

Získané inkluse byly rozpouštěny v prostředí 8M močoviny. Byly resuspendovány v rozpouštěcím pufru (10 ml pufru na 1 g inklusí) a za intenzivního chlazení sonikovány 2×30 sekund. Poté byly ponechány rozpouštět po dobu 12 hodin. Nerozpouštěné části byly odděleny centrifugací (19800×g, 20 minut, 4 °C, Beckmann J-21M). Supernatant bylo možné rovnou použít k purifikaci pomocí chelatační chromatografie na Ni-CAM nosiči.

### **5.2.3. Elektromigrační metody**

#### **5.2.3.1. Horizontální agarosová elektroforéza**

Horizontální agarosová elektroforéza je metoda určená k separaci molekul DNA a RNA. Ty se rozdělují na základě schopnosti jednotlivých fragmentů putovat agarosovým gelem, která je mimo jiné ovlivněna velikostí a konformačním uspořádáním daného polynukleotidového řetězce [84].

Agarosový gel byl připraven krátkým povařením agarosy ve 25 ml TAE pufru. Množství agarosy se měnilo podle požadované hustoty gelu. Byly používány 0,9 % gely pro větší fragmenty a 1,5 % pro menší fragmenty. Po ztuhnutí gelu a odstranění hřebenu byl gel přelit elektrodovým puftrem TAE. Vzorky byly před nanesením smíchány s 1/10 objemu vzorkového pufru.

Elektroforéza byla prováděna v soupravě vyrobené ve vývojových dílnách ČSAV při laboratorní teplotě po dobu 30 minut při napětí 100 - 110 V. Jako standard pro určení relativní velikosti fragmentů byla používána směs DNA fragmentů GeneRuler DNA Ladder Mix (MBI Fermentas).

Po skončení elektroforézy byl gel na 3 minuty přenesen do roztoku ethidium bromidu (1 mg/l) v 1×TAE pufru [85]. DNA a RNA byly vizualizovány v procházejícím ultrafialovém světle na UV-transiluminátoru Vibert-Lourmat a výsledky zdokumentovány fotoaparátem Olympus Sp500-uz.

### 5.2.3.2. Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za denaturujících podmínek

Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (SDS-PAGE) slouží k analýze směsi proteinů. SDS narušuje sekundární a terciární strukturu proteinů a minimalizuje rozdíly v nativním náboji různých proteinů. Všechny proteiny se tedy pohybují jako anionty podobného tvaru a oddělují se od sebe na základě jejich relativní pohyblivosti. Tak lze stanovit jejich přibližnou molekulovou hmotnost [86].

SDS-PAGE byla prováděna podle Laemmliho [87]. Rozměry deskových gelů byly 80 x 70 x 0,75 mm. Dělicí gel obsahoval 10%, 12,5%, 15%, 17,5% nebo 20% akrylamid (AA) a N,N'-metylen-bis(akrylamid) (BIS) v hmotnostním poměru BIS:AA 1:36,5; 375mM Tris-HCl pH 8,8; 1mM EDTA; 5% (v/v) glycerol; 0,1% SDS; 0,1% (v/v) TEMED a 0,1% persíran amonný, kterým byla iniciována polymerace. Zaostrovací gel obsahoval 5% AA a BIS ve stejném poměru jako dělicí gel; 125mM Tris-HCl pH 6,8; 1mM EDTA; 0,5% (v/v) glycerol; 0,1% SDS; 0,1% TEMED a 0,1% persíran amonný.

Po přípravě a ztuhnutí byly gely připevněny do přístroje pro vertikální SDS-PAGE (Mighty Small II SE 250) a komora byla naplněna elektrodovým pufrům. Vzorky proteinu byly před nanesením na zaostrovací gel smíchány v poměru 2:1 se vzorkovým pufrům, povařeny 3 minuty na vodní lázni a krátce centrifugovány (12400×g, 30 s, laboratorní teplota, Mini Spin).

Elektroforéza byla prováděna v prostředí elektrodového pufru za laboratorní teploty při výkonu 3 W/gel (proměnné elektrické napětí i proud). Jako standard molekulových hmotností byla používána směs proteinů „Broad Range“ (Biorad), která obsahovala myosin (200 kDa),  $\beta$ -galaktosidasu (116,3 kDa), fosforylasu b (97,4 kDa), sérový albumin (66,2 kDa), ovalbumin (45 kDa), karbonyckou anhydrazu (31 kDa), trypsinový inhibitor (21,5 kDa), lysozym (14,4 kDa) a aprotinin (6,5 kDa).

Pokud byl gel určen pro WB byly kromě výše zmíněných „Broad Range“ standardů používány také barevné standardy „Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder“ (MBI Fermentas) obsahující směs předbarvených rekombinantních proteinů o velikosti 10 kDa (zelená), 17 kDa (modrá), 26 kDa (modrá), 34 kDa (modrá), 42 kDa (červená), 52 kDa (zelená), 72 kDa (červená), 95 kDa (modrá), 135 kDa (fialová) a 260 kDa (růžová).

### **Barvení Coomassie Brilliant Blue**

V případě vyšší koncentrace proteinů byly proteiny v gelu po SDS-PAGE vizualizovány 0,05% (w/v) roztokem Coomassie Brilliant Blue R-250 ve 45% (v/v) methanolu a 10% (v/v) kyselině octové, do něhož byl gel ponořen na 15 min a poté byl odbarven v odbarvovacím roztoku 25% (v/v) methanolu a 10% (v/v) kyseliny octové [88, 89].

### **Barvení stříbrem**

Proteiny o nižší koncentraci byly na SDS-PAGE gelu vizualizovány stříbrem pro větší citlivost metody. Nejdříve byly proteiny v gelu fixovány 1 hodinu fixačním roztokem. Následně byl gel třikrát postupně po dobu 5, 10 a 15 min omýván 50% (v/v) roztokem methanolu, poté byl 20 sekund omýván 0,8mM roztokem  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  a třikrát krátce opláchnut destilovanou vodou. Poté byl ponechán 20 minut inkubovat v barvicím roztoku, důkladně několikrát opláchnut destilovanou vodou a přenesen do vyvolávacího roztoku. Barvení gelu bylo zastaveno roztokem 12% (v/v) kyseliny octové a 50% (v/v) methanolu a nakonec byl gel omyt a uchován v 50% (v/v) methanolu, aby nedošlo k jeho odbarvení [90].

### **Sušení gelů**

Pro dokumentační účely byly gely 20 minut máčeny v sušicím roztoku [91] a sušeny v celofánu napnutém v sušicím rámečku.

#### **5.2.3.3. Elektropřenos proteinů na membránu (Western Blot)**

Western blot (WB) je metoda příčného elektroforetického přenosu proteinů z polyakrylamidového gelu na membránu (nejčastěji nitrocelulosovou nebo PVDF). Proteiny jsou na membráně imobilizovány ve stejném rozložení vzorku jako na gelu bez ztráty rozlišení [92]. Metoda umožňuje citlivou specifickou detekci proteinů na membráně protilátkami nesoucími radioaktivní nebo fluorescenční značku či konjugovaný enzym [93-95]

Po ukončení elektroforézy SDS-PAGE (viz kap 5.2.3.3.) byl gel 2 min inkubován spolu s nitrocelulosovou membránou ve 100 ml elektrodového pufru. Na anodu blotovacího přístroje byly položeny dva filtrační papíry zvlhčené elektrodovým pufrem, membrána, gel a nakonec opět dva vlhké filtrační papíry.

WB proteinů z polyakrylamidového gelu na nitroceluloseovou membránu byl prováděn za laboratorní teploty na aparatuře firmy The W.E.P. Company v elektroodvzdušném pufru. Na 1 cm<sup>2</sup> membrány byl aplikován konstantní elektrický proud o velikosti 1,5 mA po dobu 1,5 hodiny. Účinnost přenosu byla zkontrolována reversibilním barvením membrány Ponceau S [96].

Membrána byla odbarvována promýváním v 1×TBS pufru (3× po dobu 10 minut). Poté byla jednu hodinu inkubována v blokovacím pufru a byla opět promývána 3× po dobu 10 minut v 1×TBS pufru. Následně byla inkubována s protilátkou Anti – His G-HRP Antibody, která je konjugována s křenovou peroxidasou (2000× ředěná blokovacím pufrům), po dobu jedné hodiny při laboratorní teplotě za stálého třepání a poté opět promývána 3× po dobu 10 minut v 1×TBS pufru. Proteiny specificky rozpoznávané primární protilátkou byly vizualizovány přidávkou chromogenního substrátu křenové peroxidasy 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidinu.

#### **5.2.4. Chromatografické metody**

##### **5.2.4.1. Afinitní chromatografie fuzních proteinů**

Afinitní chromatografie je metoda založená na vysoce specifických interakcích jako je interakce antigenu s protilátkou, receptoru s ligandem nebo enzymu se substrátem. Rekombinantní proteiny mohou být geneticky modifikovány tak, že jsou exprimovány ve fuzi s proteinem schopným takto specificky interagovat. Toho se pak využívá k purifikaci a částečnému zahuštění proteinu.

Při práci byly jako fuzní proteiny používány maltosu-vázající protein (MBP) a glutathion-S-transferasa (GST); při jejich spojení s jiným proteinem obecně dochází ke zlepšení rozpustnosti proteinu a zvýšení hladiny exprese. Jako první purifikační krok byla u fuzních proteinů použita afinitní chromatografie. Při purifikaci proteinů ve fuzi s MBP byl použit chromatografický nosič Amylose Resin a při purifikaci proteinů ve fuzi s GST byl použit chromatografický nosič Glutathion Sepharosa [97-99].

Chromatografie byla prováděna v chladové místnosti při teplotě 4 °C nebo při laboratorní teplotě. Roztok rekombinantního proteinu byl dialyzován do ekvilibračního pufru a centrifugován (19600×g, 30 minut, 4 °C, Beckmann J-21M, Hermle Z 323 K, Hettich Zentrifugen EBA 12R). Kolona (10 mm×60 mm) byla ekvilibrována filtrovaným ekvilibračním pufrům (složení shodné s pufrům použitým při dialýze) a následně byl

na kolonu nanesen vzorek. Rychlost průtoku byla cca 0,5 ml/min. Kolona byla poté promyta ekvilibračním pufr.

Pro eluci rekombinantního proteinu ve fuzi s MBP byl použit ekvilibrační pufr s přidavkem 10mM maltosy, pro eluci rekombinantního proteinu ve fuzi s GST byl použit ekvilibrační pufr s přidavkem 100mM glutathionu. Objem jímaných frakcí byl vždy stejný jako objem chromatografického nosiče. Eluované frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (viz kap. 5.2.3.3.).

#### 5.2.4.2. Chelatační chromatografie

Některé aminokyseliny vykazují silnou afinitu k dvojmocným iontům některých kovů (Ni, Cu, Zn), čehož lze využít při purifikaci proteinů. Nejvyšší afinitu má histidin a této jeho vlastnosti se využívá při chelatační chromatografii. Při klonování se do konstruktů na některý z konců proteinu přidává takzvaná histidinová kotva (5 - 7 histidinových zbytků). Tato kotva umožní interakci proteinu s imobilizovaným iontem kovu na koloně. Vázané proteiny lze pak eluovat gradientem imidazolu, který má k iontu kovu podstatně větší afinitu než histidin [100].

Jako první purifikační krok byla u proteinů opatřených histidinovou kotvou použita chelatační chromatografie na koloně Ni-CAM (Ni-agarosa) HC Resin, která zároveň sloužila k zahuštění vzorku. Chromatografie byla prováděna v chladové místnosti při teplotě 4 °C nebo při laboratorní teplotě. Před nanesením na kolonu byl roztok rekombinantního proteinu centrifugován (19600×g, 30 minut, 4 °C, Beckmann J-21M, Hermle Z 323 K, Hettich Zentrifugen EBA 12R). Kolona (10 mm × 20 mm, 10 mm × 30 mm nebo 10 mm × 50 mm) byla ekvilibrována filtrovaným ekvilibračním pufr a následně byl na kolonu nanesen vzorek. Rychlost průtoku byla cca 1 ml/min. Kolona byla poté promyta ekvilibračním pufr a následně ekvilibračním pufr s přidavkem 5mM imidazolu pro odstranění nespecificky navázaných makromolekulárních příměsí.

Pro eluci rekombinantního proteinu byl použit ekvilibrační pufr s přidavkem 250mM imidazolu. Objem jímaných frakcí byl vždy stejný jako objem chromatografického nosiče, standardně se pohyboval v rozmezí 2 - 4 ml. Eluované frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (viz kap. 5.2.3.3.).



### **5.2.5. Stanovení koncentrace proteinu měřením absorbance**

Při stanovování koncentrace proteinů v roztoku je možné využívat schopnosti postranních řetězců některých aminokyselinových zbytků specificky absorbovat při vlnové délce 280 nm ( $A_{280}$ ) [101].

$A_{280}$  byla měřena při pokojové teplotě pomocí přístroje NanoDrop ND-1000 (z kapky vzorku o objemu 1  $\mu$ l) nebo pomocí přístroje Ultrospec 3100*pro* (v křemenných kyvetách s optickou dráhou 1 cm). Hodnota teoretického absorpčního koeficientu při 280 nm používaného pro výpočet koncentrace daného proteinu byla z jeho sekvence vypočítána programem ExPASy - ProtParam Tool [102].

### **5.2.6. Dialýza a ultrafiltrace**

Dialýza je děj, který slouží k šetrnému převedení makromolekul do jiného prostředí nebo k separaci makromolekul od nízkomolekulárních příměsí. Hnací silou je koncentrační gradient na porézní membráně mezi retentátem a dialyzátem [103].

Proteinové roztoky byly dialyzovány při teplotě 4 °C nebo při laboratorní teplotě proti vhodnému pufru za stálého míchání dialyzátu. Pufry byly vždy 3 - 5× vyměněny za čerstvé. Byla použita dialyzační membrána s mezní velikostí 3 kDa a 10 kDa pro globulární proteiny. Po dialýze byl retentát vždy centrifugován (23100×g, 35 minut, 4 °C, Hermle Z 323 K) pro odstranění případných agregátů.

Ultrafiltrace slouží mimo jiné k zahuštění proteinových roztoků. Hnací silou je tlak vyvíjený na retentát nad porézní membránou, přes kterou do filtrátu prochází spolu s vodou menší molekuly a ionty [103].

Proteinové roztoky byly zahušťovány centrifugací při 4 °C v koncentrátorech Amicon Ultra nebo Microcon (Millipore) s membránami o mezní velikosti 3 - 10 kDa pro globulární proteiny. Odstředivé zrychlení bylo nastaveno vždy podle pokynů výrobce [104, 105].

### **5.2.7. N-koncová sekvenace proteinů**

N-koncová sekvenace připravených proteinů byla prováděna v laboratoři Ing. Z. Voburky (ÚOCHB AV ČR v. v. i.) odbouráváním podle Edmana [106]. Vzorky pro sekvenaci byly po SDS-PAGE (viz kap. 5.2.3.3.) přeneseny z gelu pomocí WB

(viz kap. 5.2.3.4) na PVDF (polyvinylidendifluorid) membránu [107] a obarveny roztokem Coomassie Brilliant Blue R-250 (viz kap. 5.2.3.3.). Membrána byla ponechána v odbarvovacím roztoku (který byl cca každou hodinu vyměňován za čerstvý), dokud nedošlo k odbarvení pozadí, a poté byla oplachována 3 - 5× vodou po dobu 15 minut.

#### **5.2.8. Ověření interakce proteinů vazbou komplexu na Ni-CAM HC nosiči (tzv. „Pull-down“ stanovení)**

„Pull-down“ stanovení je *in vitro* metoda, pomocí které se dá potvrdit fyzikální interakce dvou či více proteinů. Tato metoda vyžaduje purifikovaný protein sloužící jako „návnada“ k zachycení vazebného partnera („kořisti“), jenž je možné využitím specifického afinitního ligandu imobilizovat. Pokud dochází k interakci mezi „návnadou“ a „kořistí“, vzniká komplex, který je možné zachytit na afinitní nosič.

Bylo provedeno stanovení interakce dvou rekombinantně připravených fragmentů proteinů PogZ (ctPogZ) a LEDGF/p75 (IBD). CtPogZ byl opatřen histidinovou kotvou, proto bylo využito možnosti chelatace tohoto proteinu pomocí Ni-CAM HC nosiče. Roztoky těchto proteinů byly smíchány tak, aby poměr molárního zastoupení proteinů byl přibližně 2:1 (PogZ:IBD), a ponechány inkubovat při laboratorní teplotě. Poté byl ke vzorkům přidán ekvilibrovaný nosič (5× menší objem, než byl objem směsi proteinů) a spolu s ním byly vzorky za stálého mírného míchání při teplotě 4 °C po dobu 30 minut inkubovány. Poté byly centrifugovány (5000×g, 10 minut, 4 °C, Hermle Z 323 K). Supernatant byl uschován pro následnou analýzu a peleta (usazený nosič) byla 3× promyta ekvilibračním pufrům (vždy desetinásobkem objemu nosiče).

Následně byl k nosiči přidán eluční pufr a vzorek byl ponechán za stálého míchání při teplotě 4 °C po dobu 30 minut inkubovat. Vzniklá suspenze byla centrifugována (5000×g, 10 minut, 4 °C, Hermle Z 323 K). Supernatant i usazený nosič byly uschovány pro následnou analýzu. Získané vzorky byly analyzovány prostřednictvím SDS-PAGE (viz kap. 5.2.3.3.).

## 6. VÝSLEDKY

Od spolupracující laboratoře „Laboratory of Molecular Virology and Gene Therapy, Division of Molecular Medicine“ z Katholieke Universiteit v Leuvenu získala naše laboratoř plasmidové konstrukty připravené pro expresi úseků proteinů LEDGF/p75 (plasmid pGEX p75 IBD) a PogZ (plasmid pMAL ctPogZ). Plasmidy byly amplifikovány transformací *E. coli* DH5  $\alpha$  (viz kap. 5.2.1.4.). Získaná plasmidová DNA byla z bakteriální kultury izolována metodou minipreparace (viz kap. 5.2.1.5.).

Plasmidy byly podrobeny restriční analýze, čímž byla ověřena integrita klonovacích míst a přítomnost inzertu ve vektoru (viz kap. 5.2.1.1.). U plasmidu pMAL ctPogZ byla ověřena štěpící místa pro Not I, BamH I, Nde I a EcoR I a u pGEX p75 IBD štěpící místa pro BamH I a EcoR I. Všechna ověřovaná restriční místa byla funkční.

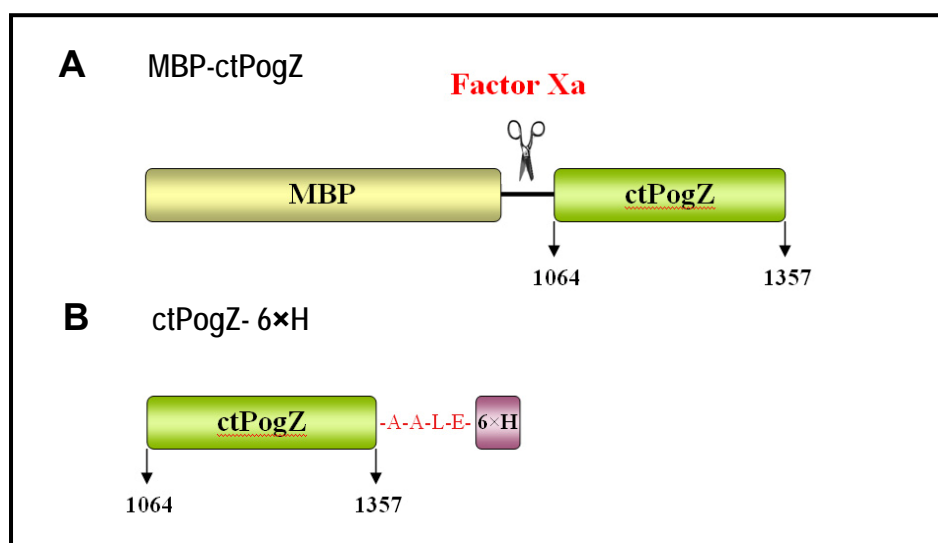
### 6.1. Konstrukty pro expresi ctPogZ

Pro přípravu C-koncového úseku proteinu PogZ (ctPogZ, aminokyselinové zbytky 1008–1357) byly použity dva plasmidové konstrukty. Proteinové produkty použitých konstruktů jsou schématicky znázorněny na **Obrázku 5** (str. 52). Z výsledků predikce strukturních motivů proteinu PogZ vyplývá, že se v jeho C-koncové části nachází DDE doména. Součástí DDE domény je SID zprostředkovávající interakci s IBD, jejíž identifikace je popsána v publikaci Bartholomeeusen K. et al. (viz **Obrázek 4**, str. 25) [3]. Připravovaný úsek ctPogZ byl navržen tak, aby obsahoval celou DDE doménu.

První z konstruktů kódoval fuzní protein sestávající z MBP a ctPogZ, mezi nimiž se nacházelo štěpné místo pro Factor Xa (viz **Obrázek 5 A**, str. 52). Plasmid pro jeho produkci byl získán od spolupracující laboratoře z Katholieke Universiteit.

Příprava MBP-ctPogZ fuzního proteinu byla předmětem mé diplomové práce a je popsána v následující kapitole. Jak bude blíže popsáno, při přípravě tohoto fuzního proteinu se ukázalo, že jej nelze připravit v kvalitě a množství dostatečných pro strukturní studie, a pro přípravu proteinu použít alternativní konstrukt, který při expresi poskytuje ctPogZ opatřený pouze krátkou histidinovou kotvou (ctPogZ-6×H).

Pro přípravu tohoto konstruktu byl použit komerční plasmid pET 22b, do nějž byla vložena DNA fragmentů (NdeI – NotI) kódujícího C-koncový úsek proteinu PogZ získaný z výše popsaného plasmidu pro expresi MBP-ctPogZ fuzního proteinu pomocí PCR. Konstrukt ctPogZ-6×H byl navržen tak, aby byl po indukci ETG exprimován ctPogZ, na jehož C-konci byla připojena histidinová kotva sestávající z šesti histidinových zbytků (viz **Obrázek 5 B**, str. 52). Protein z tohoto konstruktu se byl připraven v dostatečném množství a uspokojivé čistotě. Příprava ctPogZ-6×H nebyla předmětem mé diplomové práce, nicméně tento protein jsem v průběhu studia použila pro testování vazebné aktivity IBD domény LEDGF/p75.

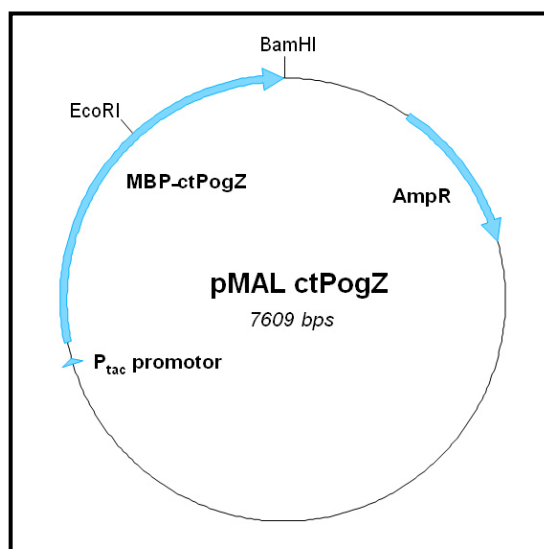


**Obrázek 5: Schématické znázornění fuzních proteinů použitých pro přípravu C-koncového úseku proteinu PogZ**

**A:** fuzní protein MBP-ctPogZ se skládá z maltosu vázajícího proteinu (MBP) a C-koncového úseku proteinu PogZ (ctPogZ) a obsahuje štěpné místo pro Factor Xa; **B:** protein PogZ-6×H se skládá z C-koncového úseku proteinu PogZ (ctPogZ) na jehož C-konci se nacházejí 4 aminokyselinové zbytky (A-A-L-E) a histidinová kotva (6×H).

#### 6.1.1. Příprava MBP-ctPogZ

Fuzní protein MBP-ctPogZ byl připraven expresí v *E. coli* za použití expresního plasmidu, jehož schéma je ukázáno na **Obrázku 6** (str. 53). Exprese je u tohoto plasmidu řízena inducibilním systémem pod kontrolou *tac* promotoru  $P_{tac}$ , který je regulován *lac* operátorem. V tomto plasmidu je jako selekční marker zahrnuta resistance na ampicilin.



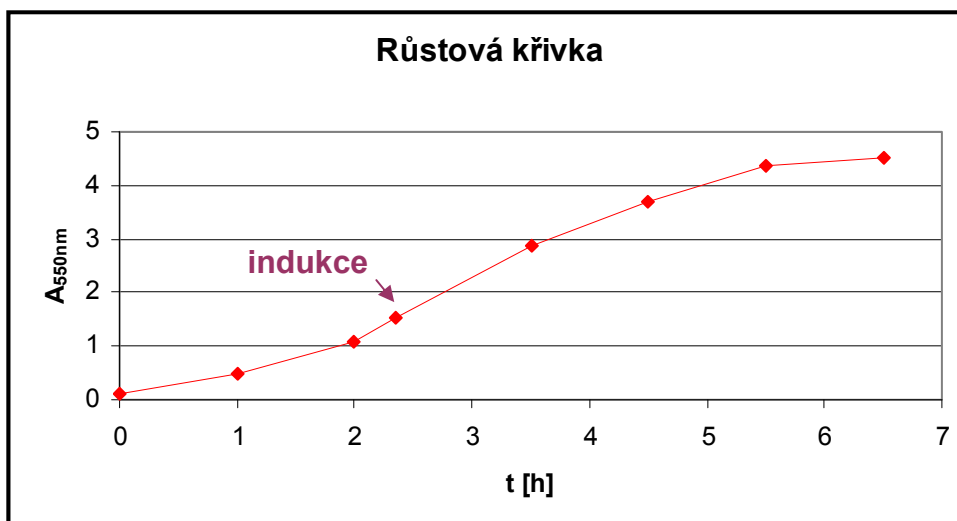
**Obrázek 6: Mapa plasmidu pMAL ctPogZ**

Expresní plasmid byl vytvořen včleněním genetické informace kódující C-koncový fragment PogZ do vektoru pMAL p2x umožňujícího exprimovat rekombinantní proteiny ve fuzi s MBP (při klonování byla použita restrikční místa pro EcoR I a BamH I). Plasmidová DNA sestává z 7609 párů basí. Exprese je řízena inducibilním systémem pod kontrolou *tac* promotoru  $P_{tac}$ . Selekčním markerem je resistance na ampicilin (AmpR).

Tento fuzní protein má relativní molekulovou hmotnost přibližně 78,2 kDa a teoretickou hodnotu isoelektrického bodu určenou z primární sekvence 4,73. Insert byl vytvořen tak, že po odštěpení MBP zůstal na N-konci molekuly ctPogZ 4 aminokyseliny dlouhý relikt (konkrétně se jednalo o aminokyselinové zbytky I, S, E a F).

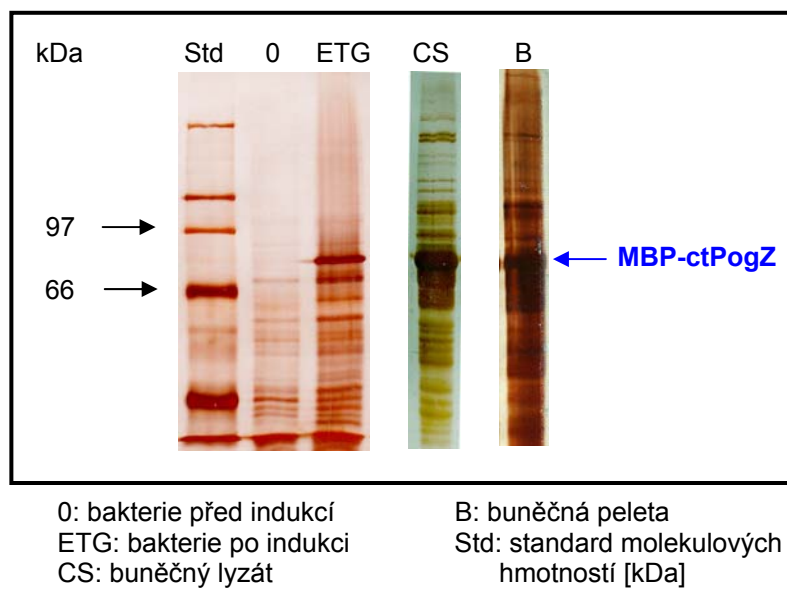
#### 6.1.1.1. Rekombinantní exprese a izolace fuzního proteinu MBP-ctPogZ

K přípravě rekombinantního fuzního proteinu MBP-ctPogZ byl používán kmen *E. coli* Rosetta 2. Exprese byla prováděna podle výše popsaného protokolu při teplotě 37 °C (viz kap. 5.2.2.1.). Na **Obrázku 7** (str. 54) je zobrazena typická růstová křivka bakteriálních kultur při produkci tohoto proteinu. V exponenciální fázi, jež byla dosažena po 2 - 2,5 hodinách kultivace, byla provedena indukce exprese přidávkem induktoru ETG (analog IPTG). **Obrázek 8** (str. 54; dráhy 0 a ETG) ukazuje vzorek buněk odebraných před a 4 h po indukci analyzovaný pomocí SDS-PAGE. Je z něj patrné, že po indukci začal být produkován protein očekávané velikosti odpovídající cca 80 kDa.



**Obrázek 7: Růstová křivka bakteriální kultury při produkci proteinu MBP-ctPogZ**

Representativní růstová křivka *E.coli* Rosetta 2 při produkci fuzního proteinu MBP-ctPogZ při 37 °C.



**Obrázek 8: Analýza vzorků z rekombinantní exprese a izolace proteinu MBP-ctPogZ**

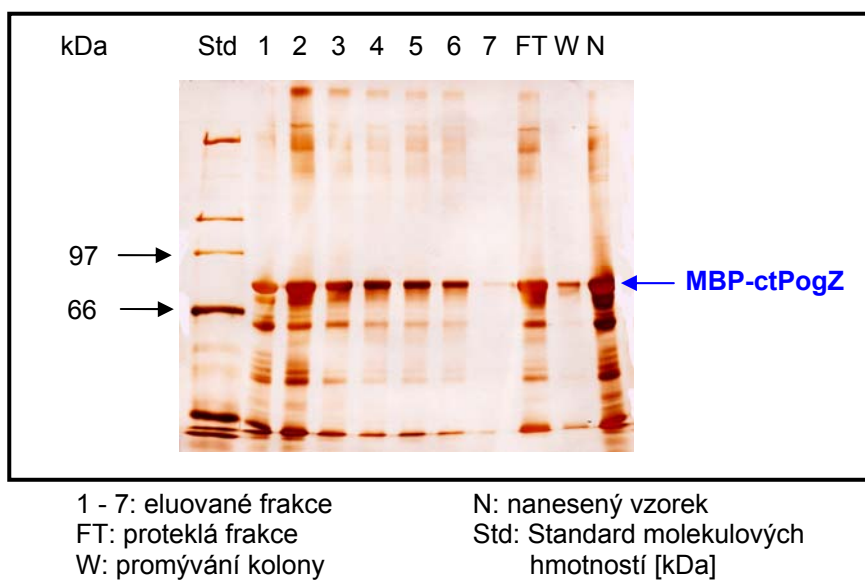
Jednotlivé frakce byly analyzovány pomocí 10% SDS-PAGE za neredukujících podmínek. Velikost MBP-ctPogZ je přibližně 78 kDa. Po indukci začal být buňkami produkován protein odpovídající velikosti (dráha ETG ukazuje vzorek odebraný 4 h po indukci), jež se po rozbití buněk ve větší míře nacházel v rozpustné frakci (dráha CS).

Výtěžek biomasy získaný po pěti hodinách kultivace po indukci činil cca 9 g (vlhká biomasa) na 1 l kultivačního média. Na základě pozorování buněk v různých fázích růstu kultury pomocí fázově kontrastního mikroskopu nebyl pozorován výskyt cytoplasmatických inklusních tělísek.

Izolace cytosolické frakce byla prováděna podle protokolu popsaného v kap. 5.2.2.2. Analýza výskytu proteinů ve vzorcích získaných při rozbití bakteriálních buněk a oddělení rozpustné a nerozpustné složky byla provedena pomocí SDS-PAGE (viz **Obrázek 8**, str. 54; dráhy CS a B). Tato analýza potvrdila výsledky pozorování kultury pomocí fázově kontrastního mikroskopu, a to že protein byl produkován v rozpustné formě a nedocházelo k jeho akumulaci do nerozpustných inklusních tělísek.

#### 6.1.1.2. Purifikace a štěpení MBP-ctPogZ

Rekombinantně získaný MBP-ctPogZ se ve větší míře nacházel v cytosolické frakci, z níž byl purifikován. Přítomnost MBP umožnila provádět purifikaci pomocí afinitní chromatografie na amylosovém nosiči (viz kap. 5.2.4.1.). Průběh purifikace byl analyzován pomocí SDS-PAGE (viz **Obrázek 9**, str. 55). Rekombinantní protein se vázal na kolonu a po promytí z ní byl eluován v přítomnosti 10mM maltosy v šesti frakcích (každá o objemu odpovídajícímu objemu použité kolony). Eluované frakce obsahovaly velký podíl MBP-ctPogZ.

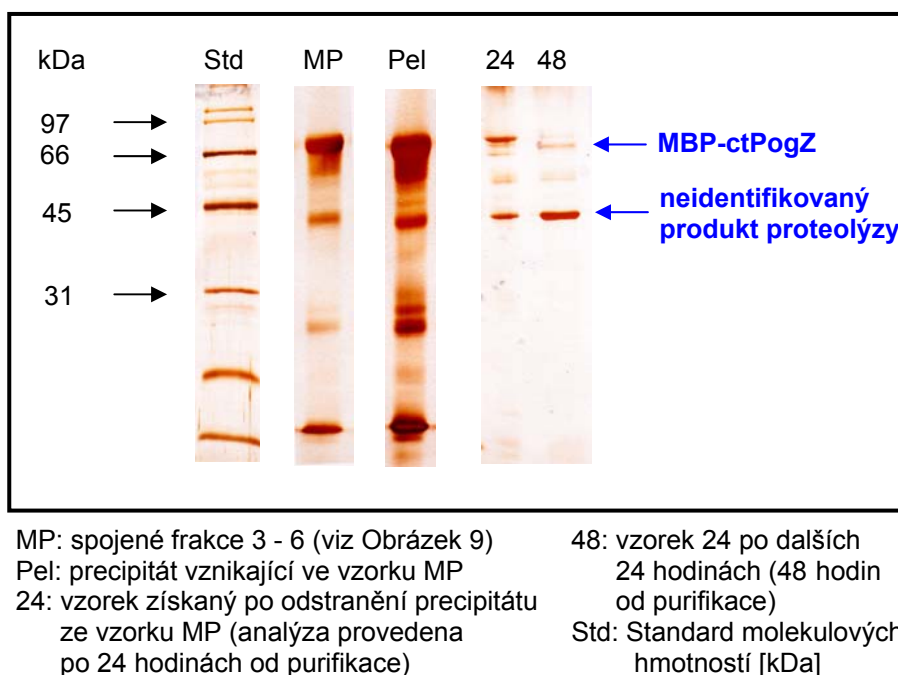


**Obrázek 9: Analýza vzorků z purifikace MBP-ctPogZ pomocí afinitní chromatografie na amylosovém nosiči**

Jednotlivé frakce byly analyzovány pomocí 10% SDS-PAGE za neredukujících podmínek. Velikost MBP-ctPogZ je přibližně 78 kDa. Afinitní chromatografie na amylosovém nosiči poskytla několik frakcí obsahujících velký podíl tohoto fuzního proteinu. Frakce 3 - 6 obsahovaly převážně MBP-ctPogZ, byly spojeny (dráha MP v obrázku 10) a použity pro další práci.

Vybrané frakce byly spojeny (vznikl tak vzorek MP, viz **Obrázek 10**, str. 56) a byly použity k optimalizaci štěpení fuzního proteinu MBP-ctPogZ prostřednictvím Factoru Xa. Byl sledován časový průběh štěpení v prostředí 50mM Tris-HCl, pH 7,8, 150mM NaCl a 1mM CaCl<sub>2</sub> při laboratorní teplotě a ve 4°C. Jako negativní kontrola byly paralelně testovány vzorky bez přidaného Factoru Xa. Z optimalizace vyplynuly závěry popsané v následujícím odstavci.

Během štěpení vzorků při laboratorní teplotě i ve 4 °C docházelo k precipitaci proteinů nacházejících se ve vzorku MP, a také k jejich proteolýze nezávisle na přídavku Factoru Xa. Vzorky MP, obsahující Factor Xa, vykazovaly stejné chování jako paralelní vzorky negativní kontroly. Níže jsou ukázána a popsána pouze data získaná analýzou vzorků, které neobsahovaly přidaný Factor Xa a během štěpení byly uchovávány ve 4°C; všechny ostatní připravené vzorky vykazovaly prakticky stejné chování.



**Obrázek 10: Analýza vzorků MBP-ctPogZ uchovávaných ve 4 °C (bez přidaného Factoru Xa)**

Jednotlivé vzorky byly analyzovány pomocí 20% SDS-PAGE za neredukujících podmínek. Při uchování purifikovaného MBP-ctPogZ ve 4 °C docházelo k precipitaci proteinů nacházejících se ve vzorku MP (dráhy MP a Pel). MBP-ctPogZ fuzní protein (78 kDa) podléhá proteolýze i v nepřítomnosti Factoru Xa (porovnání dráhy 24 a 48). Výsledkem proteolýzy je neidentifikovaný štěpný produkt o velikosti cca 44 kDa.

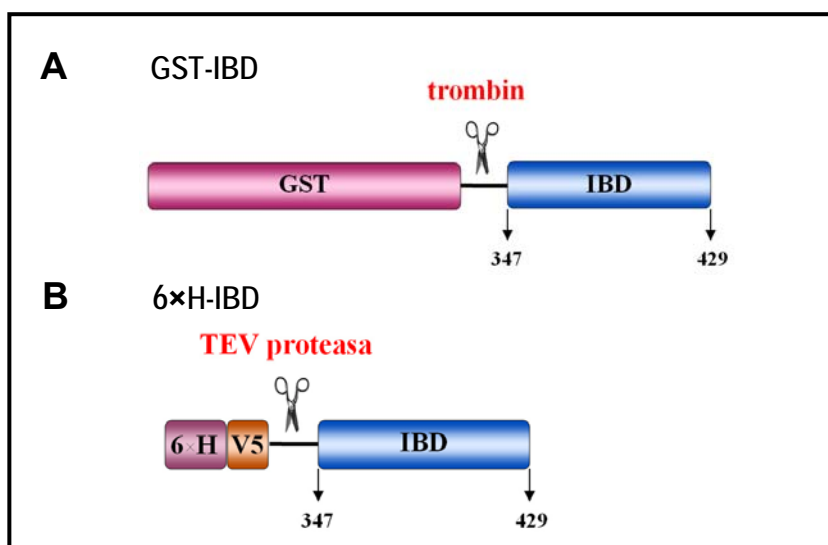


Po 24 hodinách od purifikace se ve vzorku MP vytvořil precipitát, který byl oddělen centrifugací. Výsledek analýzy vzorků získané pelety a supernatantu (dále vzorek 24) se nachází na **Obrázku 10** (str. 56; dráha Pel a 24). Ve vzorku 24 uchovávaném ve 4 °C se dále precipitát netvořil, docházelo však k rozštěpení MBP-ctPogZ fuzního proteinu. Po 48 hodinách od purifikace podlehl tento fuzní protein prakticky zcela proteolýze (viz **Obrázek 10**, str. 56; dráha 48). Produkt této proteolýzy neodpovídá očekávané velikosti ctPogZ.

Problémy se štěpením fuzního MBP-ctPogZ proteinu a jeho nestabilní chování znemožnilo přípravu ctPogZ touto cestou a bylo přistoupeno k přípravě alternativního konstruktů ctPogZ (viz **Obrázek 5 B**, str. 52), který byl popsán výše.

## 6.2. Konstrukty pro expresi IBD

Pro přípravu úseku proteinu LEDGF/p75 obsahujícího IBD (aminokyselinové zbytky 347 - 429) byly použity dva plasmidové konstrukty. Proteinové produkty použitých konstruktů jsou schématicky znázorněny na **Obrázku 11** (str. 57).



**Obrázek 11: Schématické znázornění fuzních proteinů exprimovaných během přípravy IBD proteinu LEDGF/p75**

**A:** fuzní protein připravovaný pomocí plasmidu pGEX IBD p75 se skládá z glutathion-S-transferasy (GST) a domény vázající integrasu viru HIV-1 (IBD), obsahuje štěpné místo pro trombin; **B:** protein připravovaný pomocí plasmidu 6xH-IBD se skládá z IBD, jenž má na N-konci histidinovou kotvu (6xH) a V5 epitop (V5), obsahuje štěpné místo pro proteasu viru TEV.

První z konstruktů kódoval fuzní protein sestávající z GST a IBD mezi nimiž se nacházelo štěpné místo pro trombin (viz **Obrázek 11 A**, str. 57). Tento plasmid byl získán od spolupracující laboratoře z Katholieke Universiteit.

Příprava GST-IBD fuzního proteinu je popsána v následující kapitole. Jak bude blíže popsáno, při přípravě tohoto fuzního proteinu se ukázalo, že jej nelze připravit v kvalitě a množství dostatečných pro strukturní studie, a proto byl pomocí "klonování bez ligace" za použití TOPO<sup>®</sup> - klonování (viz kap. 5.2.1.3.) připraven další konstrukt pET IBD, v němž byl IBD opatřen pouze krátkou histidinovou kotvou a V5 epitopem.

Pro přípravu tohoto plasmidového konstruktu byl použit komerční plasmid pET151/D-TOPO<sup>®</sup>, do nějž byl vložen fragment DNA kódující IBD získaný z výše popsaného plasmidu pro expresi GST-IBD fuzního proteinu.

Konstrukt kódoval IBD, na jehož N-konci byl připojen V5 epitop a histidinová kotva. Mezi IBD a V5 epitopem se nacházelo štěpné místo pro TEV (Tobacco Etch Virus) proteasu (viz **Obrázek 11 B**, str. 57). Jak bude blíže popsáno, protein z tohoto konstruktu se podařilo připravit dostatečném množství a uspokojivé čistotě, histidinová kotva a V5 epitop byly odštěpeny a získaný IBD byl použit pro testování vazebné aktivity.

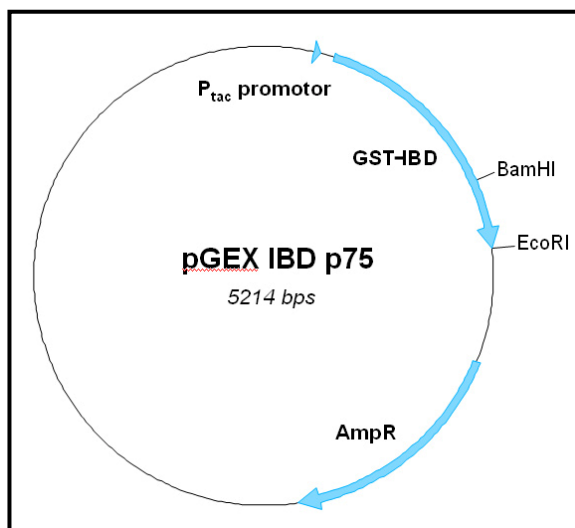
### **6.2.1. Příprava fuzního proteinu GST-IBD**

První pokusy o přípravu IBD vycházely z postupu popsaného v literatuře [46]. IBD byl exprimován ve fuzi s GST. K jeho přípravě bylo využito expresního plasmidu jehož schéma je ukázáno na **Obrázku 12** (str. 59).

Tento plasmid byl připraven z plasmidu pGEX 2TK, do nějž byla pomocí molekulárního klonování včleněna DNA kódující fragment proteinu LEDGF/p75, který v sobě zahrnuje IBD (kodóny pro aminokyselinové zbytky 347 - 429). Konstrukt byl navržen tak, aby byl po indukci ETG exprimován IBD na N-konci ve fuzi s GST mezi nimiž se nachází štěpné místo pro trombin (dále GST-IBD). Exprese je u tohoto plasmidu řízena inducibilním systémem pod kontrolou *tac* promotoru  $P_{tac}$ , který je regulován *lac* operátorem. Selekcčním markerem je resistance na ampicilin.

Fuzní protein GST-IBD má molekulovou relativní hmotnost přibližně 36,0 kDa a teoretický isoelektrický bod určený z primární sekvence je 8,1.

Insert byl vytvořen tak, že po odštěpení GST trombinem zůstal na N-konci molekuly IBD 9 aminokyselin dlouhý relikt (konkrétně se jednalo o aminokyselinové zbytky G, S, R, R, S, V, G a S). Takto připravený IBD má molekulovou relativní hmotnost 11,9 kDa a teoretickou hodnotu isoelektrického bodu určenou z primární sekvence 5,7.



**Obrázek 12: Mapa expresního plasmidu pGEX IBD p75**

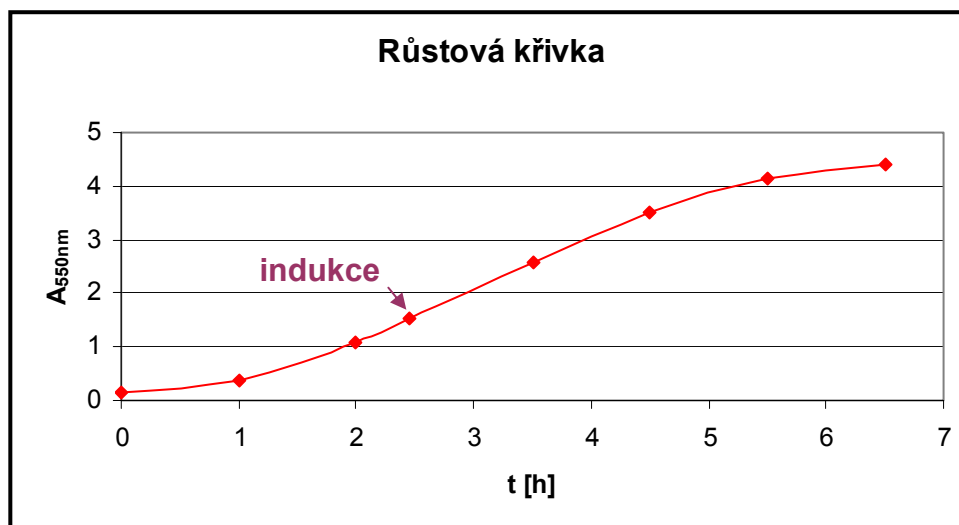
Plasmid byl vytvořen včleněním genetické informace kódující IBD do vektoru pGEX 2TK, umožňujícího exprimovat rekombinantní proteiny ve fuzi s GST, metodou molekulárního klonování. Pro klonování byla použita štěpící místa pro BamH I a EcoR I. Plasmidová DNA sestává z 5214 párů basí. Exprese je řízena inducibilním systémem pod kontrolou *tac* promotoru  $P_{tac}$ . Selekčním markerem je resistance na ampicilin (AmpR).

#### 6.2.1.1. Rekombinantní exprese a izolace GST-IBD

K přípravě fuzního proteinu GST-IBD byl jako heterologní expresní systém použit kmen *E. coli* Rosetta 2. Exprese byla prováděna podle výše popsaného protokolu (viz kap. 5.2.2.1.) při teplotě 37 °C. Na **Obrázku 13** (str. 60) je zobrazena typická růstová křivka bakteriálních kultur při produkci tohoto proteinu. V exponenciální fázi (dosažena po 2 - 3 hodinách kultivace) byla provedena indukce exprese přidávkem induktoru ETG.

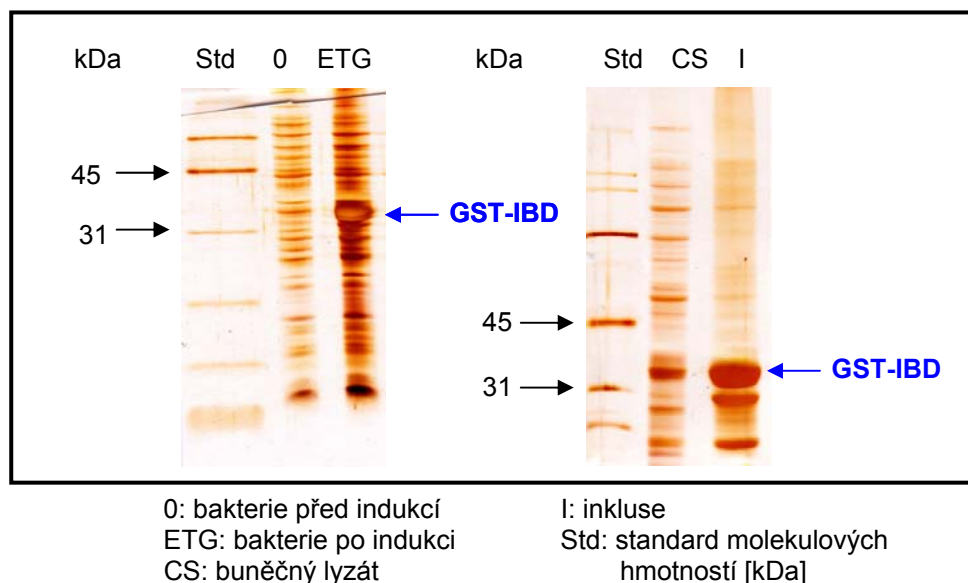
Na **Obrázku 14** (str. 60; dráhy 0 a ETG) je ukázána SDS-PAGE analýza proteinů vyskytujících se v bakteriálních buňkách před a 4 h po indukci. Je z něj patrné, že po indukci dochází k nadprodukci proteinu o velikosti cca 36 kDa, tj. velikostně odpovídajícímu GST-IBD. Výtěžek biomasy získané po pěti hodinách kultivace po indukci činil průměrně 10 g (vlhká biomasa) na 1 l kultivačního média. Na základě pozorování

buněk v různých fázích růstu kultury pomocí fázově kontrastního mikroskopu byl potvrzen vznik cytoplasmatických inklusí.



**Obrázek 13: Růstová křivka bakteriální kultury při produkci proteinu GST-IBD**

Representativní růstová křivka *E.coli* Rosetta 2 při produkci fuzního proteinu GST-IBD při 37 °C.



**Obrázek 14: Analýza vzorků z rekombinantní exprese a izolace proteinu GST-IBD**

Vzorky buněk odebrané během rekombinantní exprese byly analyzovány pomocí 15% SDS-PAGE za neredukujících podmínek a vzorky z izolace inklusí byly analyzovány pomocí 12,5% SDS-PAGE za neredukujících podmínek. Velikost GST-IBD je přibližně 36 kDa. Po indukci začal být buňkami produkován protein odpovídající velikosti (dráha ETG ukazuje vzorek odebraný 4 h po indukci), jež se po rozbití buněk ve větší míře nacházel v inklusních těliscích (dráha I), částečně se však nacházel i v rozpustné cytosolické frakci (dráha CS).

Získaná biomasa byla dále použita k izolaci inklusních tělísek, při níž došlo zároveň k oddělení buněčné cytosolické frakce. Optimalizovaný protokol je uveden v metodické části, v kap. 5.2.2.3. Analýza vzorků získaných během izolace inklusních tělísek pomocí SDS-PAGE (**Obrázek 14**, str. 60; dráhy CS a I) potvrdila výsledky pozorování kultury pomocí fázově kontrastního mikroskopu. Protein byl ve velké míře produkován v podobě inklusních tělísek, GST-IBD se však nacházel i v buněčném lyzátu. Proto byly dále zpracovávány obě tyto frakce. Níže je popsán postup izolace a renaturace GST-IBD z inkusí a postup purifikace GST-IBD z buněčného lyzátu.

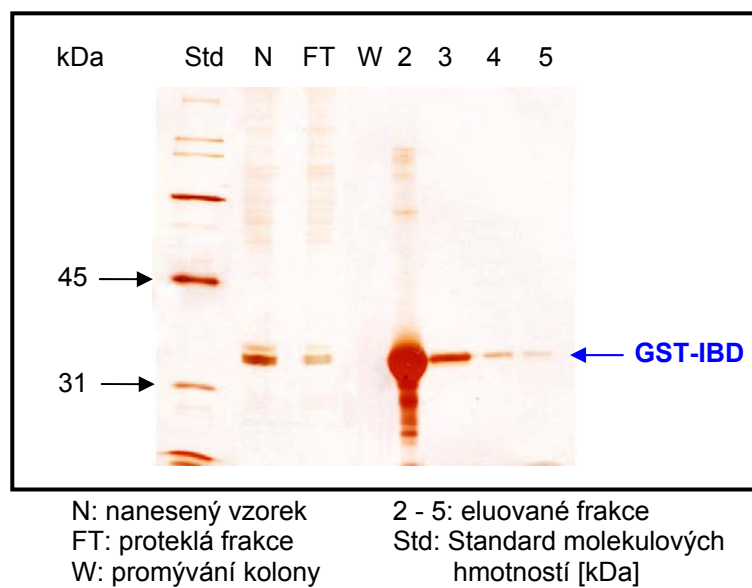
#### 6.2.1.2. Izolace GST-IBD z inkusních tělísek

Agregovaný GST-IBD fuzní protein exprimovaný v podobě inkusních tělísek bylo nutné denaturovat (rozpustit inkusní tělíska) a následně renaturovat. Postup těchto procesů byl optimalizován. Optimalizované protokoly jsou uvedeny v kapitolách 5.2.2.3. a 5.2.4.1.

Test rozpouštění izolovaných inkusních tělísek v denaturačním činidle ukázal, že rozpouštění inkusních tělísek v 8 M roztoku močoviny je účinnější než rozpouštění v 6 M roztoku guanidin hydrochloridu. K renaturaci proteinu GST-IBD byla použita metoda renaturace na sloupci Glutathion Sepharosy. Roztok obsahující denaturovaný GST-IBD byl 10×naředěn a v prostředí, nyní 800mM močoviny, imobilizován na Glutathion Sepharose. Renaturace bylo dosaženo skokově promytím nosiče pufrém bez přidané močoviny. Renaturace na koloně poskytovala větší výtěžky, než ostatní přístupy, jež spočívaly v afinitní purifikaci v denaturačním prostředí a následné renaturaci (provedené až po eluci frakcí z afinitního nosiče) ředěním a nebo postupnou dialýzou.

Průběh purifikace a renaturace byl analyzován pomocí SDS-PAGE (viz **Obrázek 15**, str. 62). Renaturovaný GST-IBD protein byl z afinitní kolony eluován v přítomnosti 100mM glutathionu (redukováná forma, dále GSH).

Dvě z eluovaných frakcí (každá o objemu odpovídajícímu dvojnásobku objemu použité kolony) obsahovaly velký podíl GST-IBD. Tyto frakce byly vždy spojeny (vznikl tak vzorek GI, viz **Obrázek 16**, str. 63) a byly použity k optimalizaci štěpení fuzního proteinu GST-IBD působením trombinu.

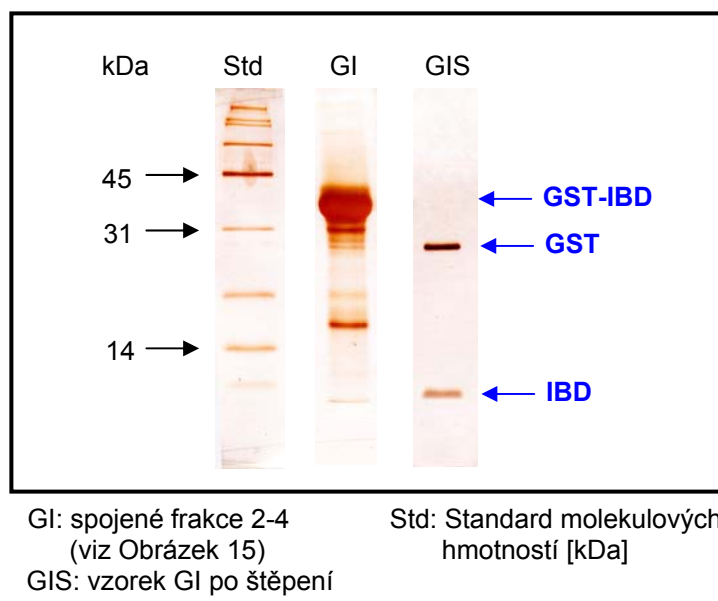


**Obrázek 15: Analýza vzorků z purifikace GST-IBD z inkusních tělísek pomocí afinitní chromatografie na Glutathion Sepharose**

Jednotlivé frakce byly analyzovány pomocí 12,5% SDS-PAGE za redukujících podmínek. Velikost GST-IBD je přibližně 36 kDa. Afinitní chromatografie na Glutathion Sepharose poskytla několik frakcí obsahujících velký podíl GST-IBD. Ty byly spojeny a použity pro optimalizaci štěpení fuzního proteinu trombinem.

Během optimalizace bylo testováno štěpení trombinem při teplotě 4°C a při laboratorní teplotě, buď vsádkově, nebo v průběhu dialýzy, v prostředí pufru o různém složení (různé složení solí, přídavek chelatačních a redukčních činidel a různé pH) a různé délce trvání reakcí. Nejúčinnější metodou se ukázalo být štěpení GST-IBD během dialýzy proti pufru o složení 50mM Tris-HCl, pH 7,8; 150mM NaCl 12 hodin při laboratorní teplotě. Vzorky byly po štěpení analyzovány pomocí SDS-PAGE. Na **Obrázku 16** (str. 63) je zobrazen vzorek GST-IBD před štěpením (dráha GI) a po štěpení (dráha GIS) ve stejné nanášce. Štěpení proběhlo úspěšně. Totožnost získaného IBD byla ověřena pomocí N-koncové sekvenace u Ing. Z. Voburky v Laboratoři analýzy proteinů ÚOCHB AV ČR v. v. i., která potvrdila identitu štěpu.

Z 1 litru bakteriální kultury bylo získáno přibližně 10 µg IBD odštěpeného z fuzního proteinu GST-IBD. I v nejvýhodnějších z vyzkoušených podmínek docházelo během štěpení k precipitaci proteinů a výsledný výtěžek byl vždy velice malý.



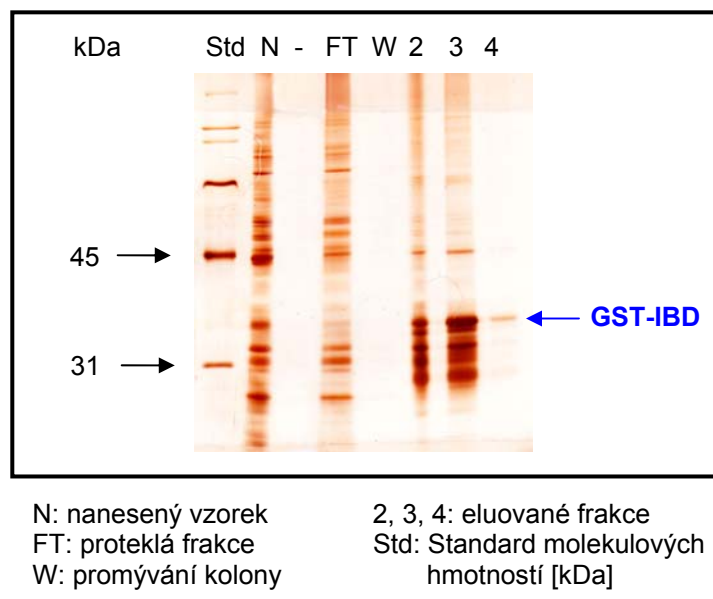
**Obrázek 16: Analýza vzorků ze štěpení GST-IBD (vzorku GI) pomocí trombinu**

Jednotlivé vzorky byly analyzovány pomocí 20% SDS-PAGE za neredukujících podmínek. Po rozštěpení GST-IBD (36 kDa) trombinem vznikly dva produkty odpovídající velikosti samotného GST (24 kDa) a IBD (12 kDa).

### 6.2.1.3. Purifikace a štěpení GST-IBD z buněčného lyzátu

Buněčný lyzát, na rozdíl od inkusních tělísek, obsahuje protein v rozpustné formě, a je tedy možné přistoupit rovnou k afinitní purifikaci. Oddělená cytosolická frakce obsahovala GST-IBD fuzní protein. Přítomnost GST umožnila provádět purifikaci pomocí afinitní chromatografie na Glutathion Sepharose (viz kap. 5.2.4.1.).

Rekombinantní protein se vázal na Glutathion Sepharosu a z ní byl eluován v přítomnosti 100mM GSH ve třech frakcích (každá o objemu odpovídajícímu dvojnásobku objemu použité kolony). Eluované frakce však obsahovaly množství dalších příměsí a množství GST-IBD nebylo dostatečné pro efektivní přípravu IBD. Průběh purifikace byl analyzován pomocí SDS-PAGE (viz **Obrázek 17**, str. 64).



**Obrázek 17: Analýza vzorků z purifikace GST-IBD z buněčného lyzátu pomocí afinitní chromatografie na Glutathion Sepharose**

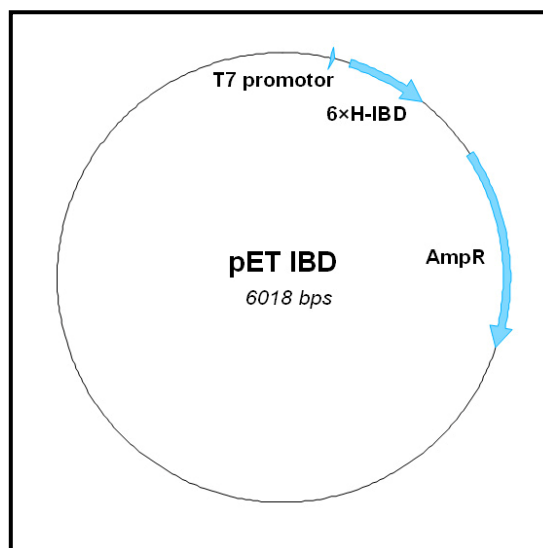
Jednotlivé frakce byly analyzovány pomocí 12,5% SDS-PAGE za neredukujících podmínek. Velikost GST-IBD je přibližně 36 kDa. Afinitní chromatografie na Glutathion Sepharose poskytla vždy několik frakcí, v nichž byly obsaženy kromě GST-IBD další příměsi.

### **6.2.2. Příprava proteinu IBD bez fuzního partnera**

K přípravě samostatného IBD bylo přistoupeno po neúspěšných experimentech s přípravou IBD ve fuzi s GST. K IBD byla připojena jen krátká kotva obsahující sekvenci pro chelatační purifikaci a pro detekci proteinu. Konkrétně byl navržen proteinový produkt, který měl na N-konci připojenou histidinovou kotvu (6×H) a V5 epitop (14 aminokyselinových zbytků) následované štěpným místem pro TEV proteasu (protein 6×H-IBD, viz **Obrázek 11 B**, str. 57).

Plasmid pro expresi 6×H-IBD v *E. coli* byl připraven metodou "klonování bez ligace" za použití TOPO<sup>®</sup> klonování (viz kap. 5.2.1.3.). Do plasmidu pET151/D-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen) byl za úsek kódující histidinovou kotvu (6×H), V5 epitop a štěpné místo rozpoznávané TEV proteasu včleněn úsek kódující IBD (aminokyselinové zbytky 347 - 429 proteinu LEDGF/p75). Vznikl tak plasmid pET IBD, jehož schéma je ukázáno na **Obrázku 18** (str. 65). Při expresi bylo využito inducibilního systému expresního plasmidu pod kontrolou *T7* promotoru v kombinaci s hostitelským kmenem *E. coli* BL21 (DE3), který obsahuje gen pro *T7* RNA-polymerasu. V tomto plasmidu je jako selekční marker zahrnuta resistance na ampicilin.





**Obrázek 18: Mapa plasmidu pET IBD**

Expresní plasmid byl vytvořen včleněním genetické informace kódující IBD do vektoru pET151/D-TOPO<sup>®</sup>, umožňujícího exprimovat rekombinantní proteiny ve fuzi s histidinovou kotvou a V5 epitopem (6×H-IBD). Plasmidová DNA sestává z 6018 párů basí. Exprese je řízena inducibilním systémem pod kontrolou T7 promotoru (pocházejícího z fága T7). Selekcčním markerem je resistance na ampicilin (AmpR).

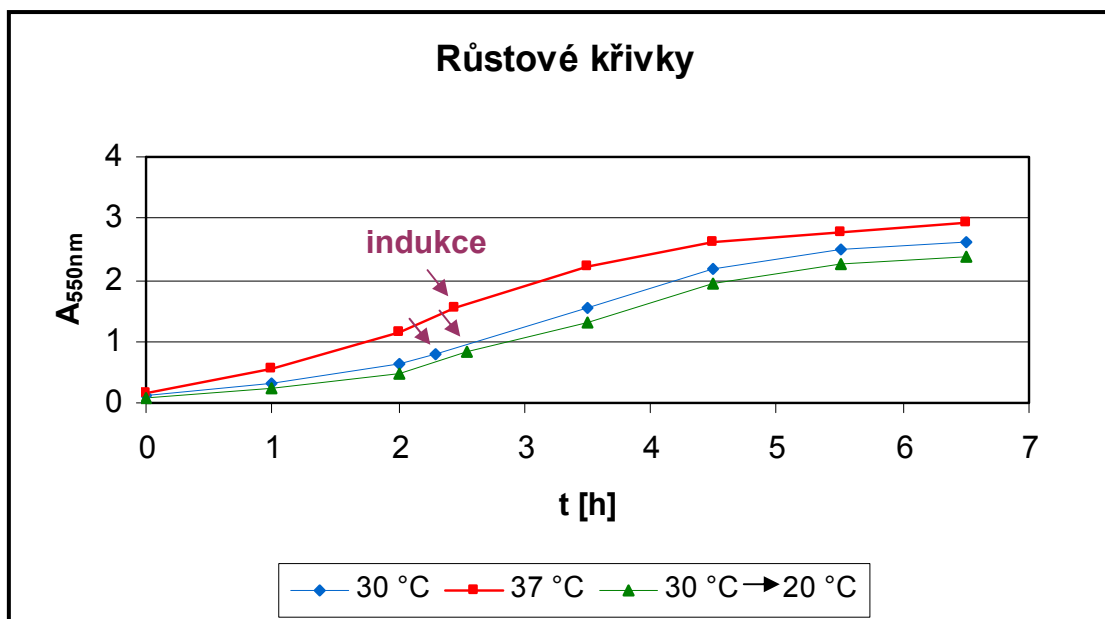
Protein 6×H-IBD má molekulovou relativní hmotnost 14 kDa a teoretickou hodnotu isoelektrického bodu určenou z primární sekvence 9,13.

Po odštěpení histidinové kotvy a V5 epitopu TEV proteasou zůstane na N-konci molekuly IBD 6 aminokyselin dlouhý relikt (konkrétně se jedná o aminokyselinové zbytky G, I, D, P, F a T). Takto připravený IBD má relativní molekulovou hmotnost 11,7 kDa a hodnota jeho isoelektrického bodu teoreticky určená z primární sekvence je 5,7.

#### **6.2.2.1. Rekombinantní exprese a izolace fuzního proteinu 6×H-IBD**

K přípravě rekombinantního proteinu 6×H-IBD byl používán kmen *E. coli* BL21 (DE3). Exprese byla prováděna podle výše uvedeného protokolu (viz kap. 5.2.2.1.) při následujících teplotách - při 37 °C po celou dobu, při 30 °C po celou dobu a při 30 °C do indukce, po níž byly kultury dále pěstovány při 20 °C.

Na **Obrázku 19** (str. 66) jsou zobrazeny typické růstové křivky bakteriálních kultur při produkci tohoto proteinu. V exponenciální fázi, jež byla dosažena po 2 - 3 hodinách kultivace, byla provedena indukce exprese přidávkem induktoru ETG.



**Obrázek 19: Růstové křivky bakteriální kultury při produkci proteinu 6×H-IBD**

Reprezentativní růstové křivky *E.coli* BL21(DE3) při produkci fuzního proteinu 6×H-IBD při 37 °C, při 30 °C a při 30 °C do indukce, po níž byla kultura dále pěstována při 20 °C.

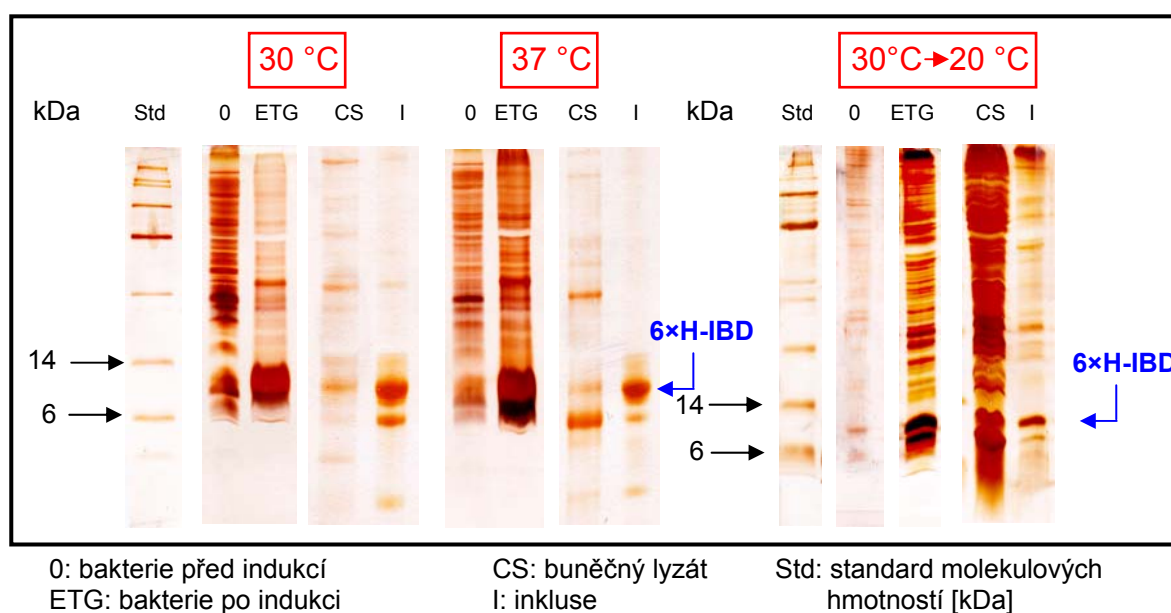
Na **Obrázku 20** (str. 67; dráhy 0 a ETG) jsou ukázány vzorky buněk odebraných vždy před a 4 h po indukci analyzované pomocí SDS-PAGE. Je z nich patrné, že po indukci dochází k nadprodukci proteinu očekávané velikosti (cca 14 kDa). Výtěžek biomasy získaný po pěti hodinách kultivace po indukci činil průměrně 8 g (vlhká biomasa) na 1 l kultivačního média při kultivaci ve 37 °C, 9 g (vlhká biomasa) na 1 l kultivačního média kultivaci ve 30 °C a 10 g (vlhká biomasa) na 1 l kultivačního média při kultivaci ve 30 °C a následně ve 20 °C.

Na základě pozorování buněk v různých fázích růstu kultury pomocí fázově kontrastního mikroskopu byl potvrzen vznik cytoplasmatických inklusí během pěstování při 37 °C a 30 °C. Během pěstování při 30 °C a po indukci při 20 °C byl vznik inklusních tělísek pozorován v menší míře.

Z biomasy získané kultivací při 37 °C a 30 °C byla izolována inklusní tělíska, přičemž došlo zároveň k oddělení cytosolické frakce. Optimalizovaný protokol je uveden v metodické části, v kap. 5.2.2.4. Analýza vzorků získaných během izolace inklusních tělísek byla provedena pomocí SDS-PAGE (viz **Obrázek 20**, str. 67; dráhy CS a I). Tato analýza potvrdila výsledky pozorování kultury pomocí fázově kontrastního mikroskopu. Během kultivace při 37 °C a 30 °C byl protein produkován prakticky pouze v podobě

inklusních tělísek. Inkusní tělíska izolovaná z těchto dvou kultur byla spojena a vzniklý vzorek byl dále zpracováván.

Po rozbití bakteriálních buněk kultivovaných při 30 °C a následně při 20 °C byla oddělena rozpustná a nerozpustná složka. Oddělené složky byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (viz **Obrázek 20**, str. 67; dráhy CS a I). Protein 6×H-IBD se nacházel jak v inkusních těliscích, tak v buněčném lyzátu. Inkusní tělíska získaná při této izolaci obsahovala výrazně menší podíl cílového produktu než ta, která byla izolovaná z kultur vypěstovaných při 37 °C a 30° C, proto byla dále byla zpracovávána pouze cytosolická frakce.

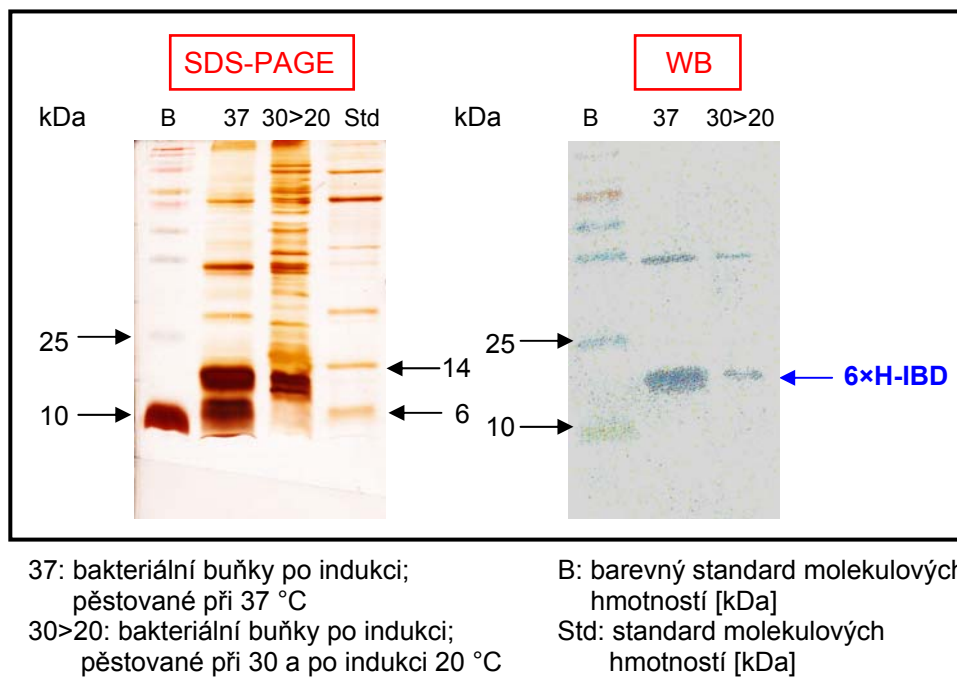


**Obrázek 20: Analýza vzorků z rekombinantní exprese a izolace proteinu 6×H-IBD**

Jednotlivé frakce byly analyzovány pomocí 20% SDS-PAGE za neredukujících podmínek. Velikost 6×H-IBD je přibližně 14 kDa. Po indukci začal být ve všech třech testovaných podmínkách buňkami produkován protein odpovídající velikosti (dráhy ETG ukazují vzorky odebrané 4 h po indukci). Po rozbití bakteriálních buněk kultur vypěstovaných při 30 °C a při 37°C se 6×H-IBD nacházel převážně v inkusních těliscích (sloupce 30 °C a 37°C, dráhy I). Po rozbití buněk kultivovaných při 30 °C a následně při 20 °C se fuzní protein 6×H-IBD nacházel jak v inkusních těliscích, tak v buněčném lyzátu (sloupec 30°C → 20 °C, dráhy CS a I).

Identita rekombinantního proteinu byla potvrzena WB. Při detekci byl použit vzorek inkusních tělísek izolovaný z biomasy vypěstované při 37 °C a vzorek cytosolické frakce izolované z biomasy kultivované při 30 °C a po indukci při 20 °C. Protein 6×H-IBD

byl detekován specifickou protilátkou rozpoznávající polyhistidinovou sekvenci a konjugovanou s křenovou peroxidasou. Vznikem barevného produktu enzymové reakce byl identifikován rekombinantní protein obsahující histidinovou kotvu (viz **Obrázek 21**, str. 68).



**Obrázek 21: Analýza vzorků z rekombinantní exprese prostřednictvím WB**

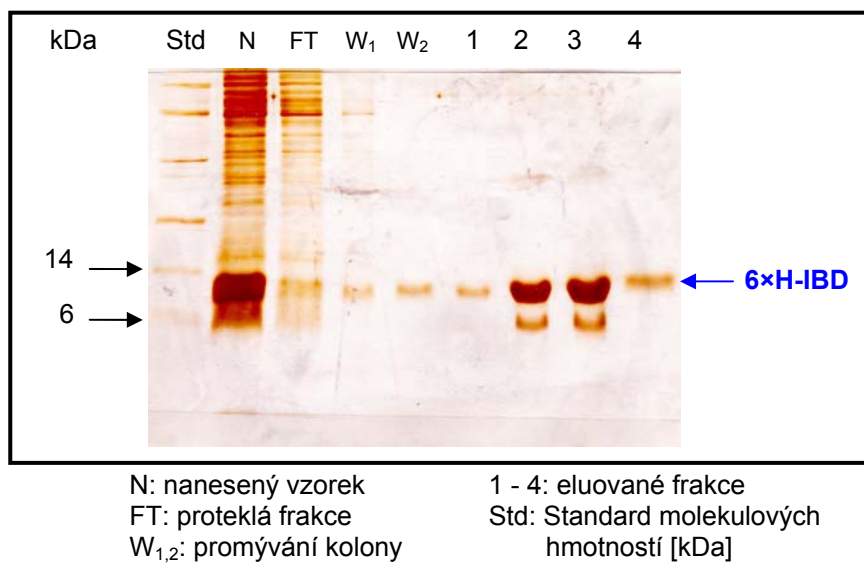
6xH-IBD byl detekován specifickou protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidasou rozpoznávající histidinovou kotvu. WB potvrdil identitu rekombinantního proteinu. Na obrázku vlevo se nachází gel (SDS-PAGE) připravený paralelně s membránou při WB.

#### 6.2.2.2. Příprava 6xH-IBD z inklusních tělísek

Agregovaný protein 6xH-IBD exprimovaný v podobě inklusních tělísek bylo nutné denaturovat (rozpustit inklusní tělíska) a následně renaturovat. Postup těchto procesů byl optimalizován. Optimalizované protokoly jsou uvedeny v kapitolách 5.2.2.4. a 5.2.4.2.

Test rozpouštění izolovaných inklusních tělísek v denaturačním činidle vedl k závěru, že použití 8 M roztoku močoviny je účinnější než použití 6 M roztoku guanidin hydrochloridu. K renaturaci proteinu 6xH-IBD byla použita metoda renaturace na sloupci Ni-CAM HC nosiče. Protein 6xH-IBD byl v denaturačním prostředí 8 M močoviny imobilizován na Ni-CAM HC nosič. Renaturace bylo dosaženo skokově převedením nosiče do pufru bez přidané močoviny. Renaturace na koloně poskytovala větší výtěžky než ostatní přístupy, jež spočívaly v chelatační purifikaci v denaturačním prostředí

a následné renaturaci (provedené až po eluci frakcí z chelatačního nosiče) ředěním a nebo postupnou dialýzou. Průběh purifikace a renaturace byl analyzován pomocí SDS-PAGE (viz **Obrázek 22**, str. 69). Renaturovaný 6×H-IBD protein byl z afinitní kolony eluován v přítomnosti 250mM imidazolu. Dvě z eluovaných frakcí (každá o objemu odpovídajícímu dvojnásobku objemu použité kolony) obsahovaly velký podíl 6×H-IBD.



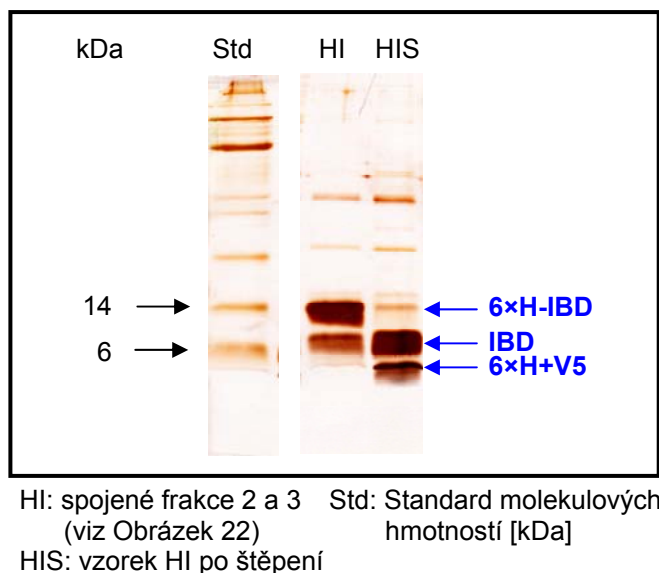
**Obrázek 22: Analýza vzorků z purifikace 6×H-IBD z inkusních tělísek pomocí chelatační chromatografie na Ni-CAM HC nosiči.**

Jednotlivé frakce byly analyzovány pomocí 20% SDS-PAGE za neredukujících podmínek. Velikost 6×H-IBD je přibližně 14 kDa. Chelatační chromatografie na Ni-CAM HC nosiči poskytla několik frakcí, v nichž byl zastoupen velký podíl 6×H-IBD. Ty byly spojeny a použity pro další práci.

Vybrané frakce byly spojeny a 5× zahuštěny. Vznikl tak vzorek HI (viz **Obrázek 23**, str. 70; dráha HI), který byl použit k optimalizaci štěpení fuzního proteinu 6×H-IBD prostřednictvím TEV proteasy.

Během optimalizace bylo testováno štěpení vždy při 4°C a při laboratorní teplotě, vsádkově a během dialýzy, v prostředí pufru o různém složení (různé složení solí, přídavek chelatačních a redukčních činidel a různé pH) a různé délce trvání reakcí. Nejefektivnější z testovaných metod bylo štěpení 6×H-IBD vsádkově v prostředí 50mM Tris-HCl, pH 7,8; 150mM NaCl 12 hodin při laboratorní teplotě. Vzorky byly po štěpení analyzovány pomocí SDS-PAGE (viz **Obrázek 23**, str. 70; dráha HIS).

Štěpením vznikly dva produkty o velikosti odpovídající samotnému IBD (11,7 kDa) a V5 epitopu s připojenou histidinovou kotvou (2,3 kDa). Jejich totožnost byla ověřena N-koncovou sekvencí, která potvrdila identitu obou vzniklých štěpů.



**Obrázek 23: Analýza vzorků ze štěpení 6xH-IBD pomocí TEV proteasy**

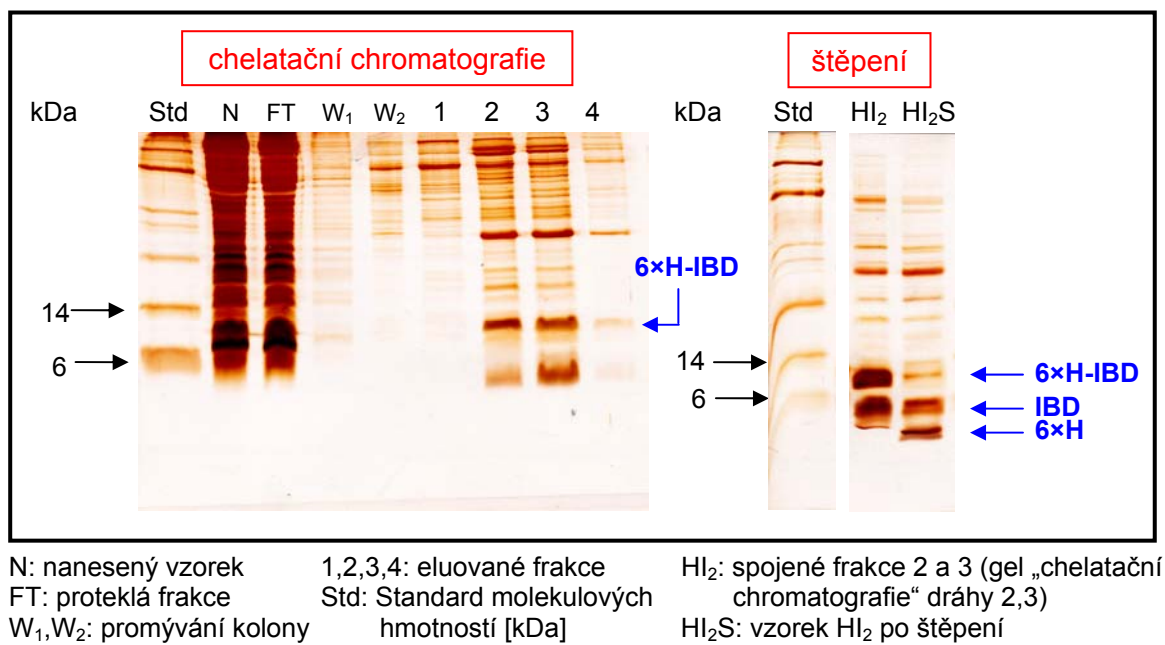
Jednotlivé vzorky byly analyzovány pomocí 20% SDS-PAGE za redukujících podmínek. Velikost 6xH-IBD je přibližně 14 kDa. Štěpením vznikly dva produkty o velikosti odpovídající samotnému IBD (11,7 kDa) a V5 epitopu s připojenou histidinovou kotvou (2,3 kDa).

### 6.2.2.3. Purifikace a štěpení 6xH-IBD z buněčného lyzátu

Cytosolická frakce získaná po rozbití bakteriálních buněk připravených kultivací při 30 °C do indukce a poté při 20°C obsahovala 6xH-IBD. Přítomnost histidinové kotvy umožnila provádět purifikaci pomocí chelatační chromatografie na Ni-CAM HC nosiči (viz kap. 5.2.4.2.). Průběh purifikace byl analyzován pomocí SDS-PAGE (viz **Obrázek 24**, str. 71). Rekombinantní protein se vázal na kolonu a byl eluován v přítomnosti 250mM imidazolu ve dvou frakcích (každá o objemu odpovídajícímu dvojnásobku objemu použité kolony). Ty byly poté spojeny (vznikl vzorek HI<sub>2</sub>) a prostřednictvím dialýzy (viz kap. 5.2.6.) zbaveny imidazolu a převedeny do prostředí optimálního pro štěpení TEV proteasou.

Při štěpení byly dodržovány podmínky, které byly optimální pro štěpení 6xH-IBD získaného z inklusních tělísek (vsádkové provedení štěpení v prostředí 50mM Tris-HCl,

pH 7,8; 150mM NaCl 12 hodin při laboratorní teplotě). Vzorky byly po štěpení analyzovány pomocí SDS-PAGE (viz **Obrázek 24**, str. 71; dráha HI<sub>2</sub>S).



**Obrázek 24: Analýza vzorků z purifikace 6xH-IBD z buněčného lyzátu pomocí chelatační chromatografie na Ni-CAM HC nosiči a ze štěpení pomocí TEV proteasy.**

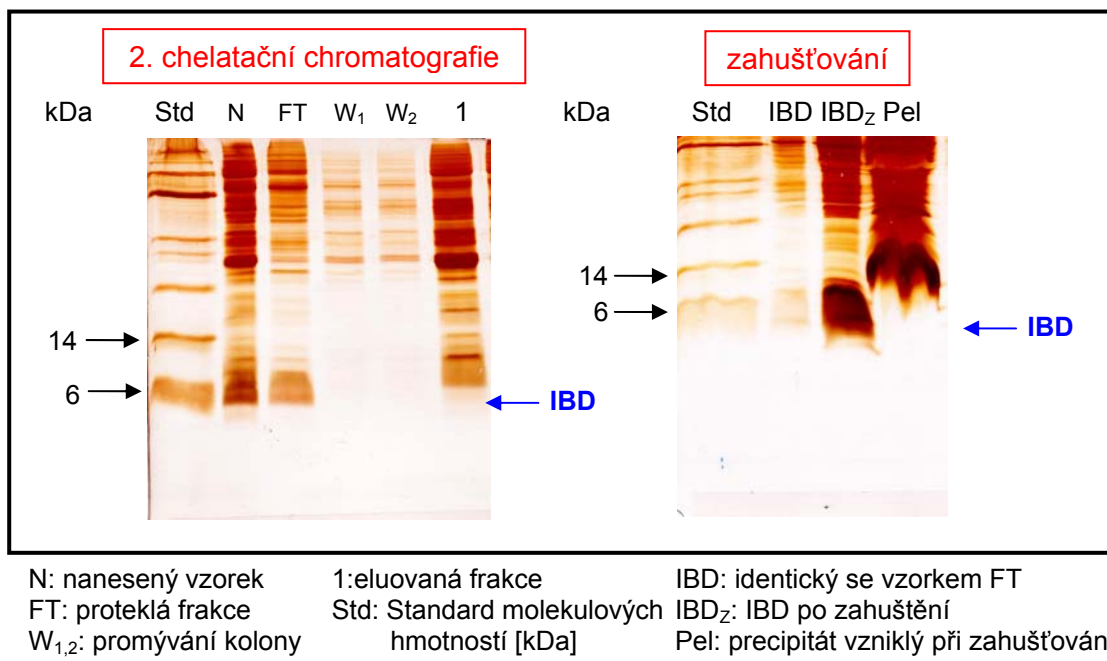
Jednotlivé frakce byly analyzovány pomocí 20% SDS-PAGE za neredukujících podmínek. Velikost 6xH-IBD je přibližně 14 kDa. Chelatační chromatografie na Ni-CAM HC nosiči poskytla vždy dvě frakce obsahující částečně purifikované 6xH-IBD. Ty byly spojeny a ponechány štěpit TEV proteasou. Štěpením vznikaly dva produkty o velikosti odpovídající samotnému IBD (11,7 kDa) a V5 epitopu s připojenou histidinovou kotvou (2,3 kDa).

Štěpením vznikaly dva produkty o velikosti odpovídající samotnému IBD (11,7 kDa) a V5 epitopu s připojenou histidinovou kotvou (2,3 kDa), jejichž totožnost byla opět ověřena pomocí N-koncové sekvenace. Výsledky sekvenace potvrdily identitu vznikajících štěpů. TEV proteasa a odštěpený V5 epitop (oba nesoucí histidinovou kotvu) byly ze vzorku odstraněny (zachyceny) pomocí druhé chelatační chromatografie na Ni-CAM HC nosiči, zatímco IBD protekl kolonou. Průběh chelatační chromatografie byl analyzován pomocí SDS-PAGE (viz **Obrázek 25**, str. 72).

Získaný IBD (viz **Obrázek 25**, str. 72; dráha IBD) byl po provedení druhé chelatační chromatografie vždy 20× zahuštěn (viz kap. 5.2.6.). Během zahušťování docházelo k precipitaci proteinů ve vzorku; v precipitátu se však IBD téměř nenacházel. Tento krok tedy poskytl další částečnou purifikaci vzorku (viz **Obrázek 25**, str. 72; dráhy



IBD<sub>Z</sub> a Pel). Tímto postupem byl získán vzorek IBD, který byl použit pro charakterizaci jeho vazby s C-koncovým úsekem proteinu PogZ (viz kap. 6.1).



**Obrázek 25: Analýza vzorků z purifikace IBD pomocí druhé chelatační chromatografie na Ni-CAM HC nosiči a zahušťování IBD.**

Jednotlivé vzorky byly analyzovány pomocí 20% SDS-PAGE za redukujících podmínek. Velikost IBD je přibližně 11 kDa. Druhá chelatační chromatografie na Ni-CAM HC nosiči umožnila oddělit IBD od TEV proteasy a odštěpeného V5 epitopu, jenž oba nesou histidinovou kotvu. Proteklá frakce (dráha FT a IBD (identické vzorky)) byla dále zahušťována (dráha IBD<sub>Z</sub>). Během zahušťování docházelo k precipitaci (dráha Pel). V precipitátu se IBD téměř nenacházel, docházelo při ní tedy k další částečné purifikaci vzorku.



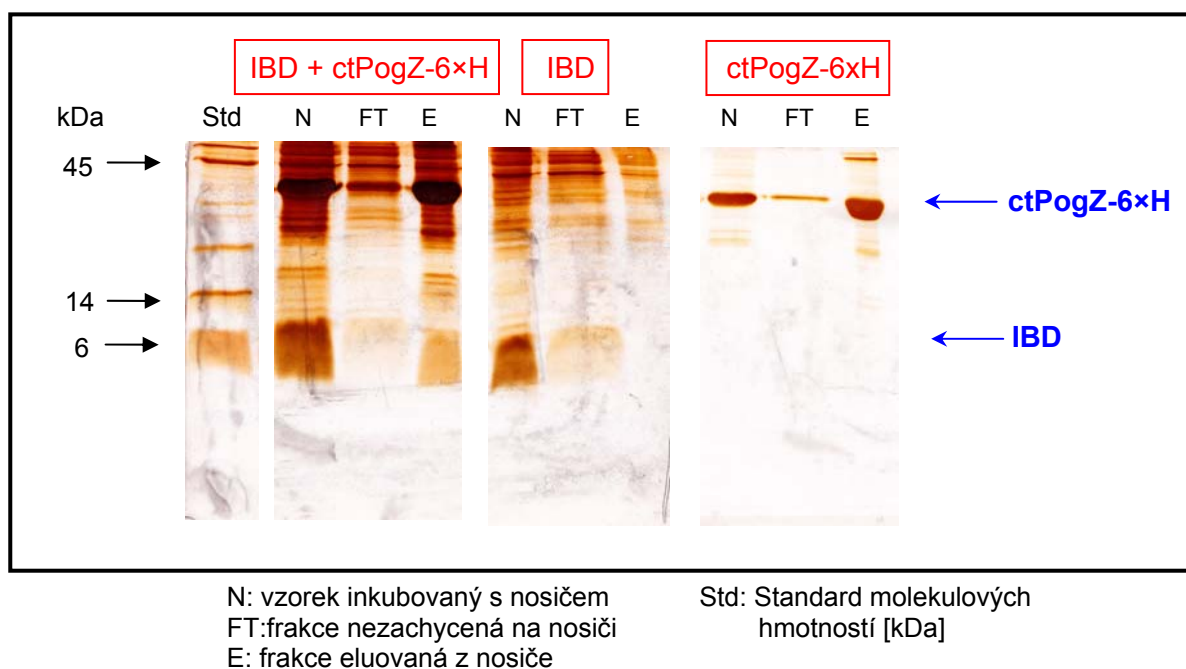
### 6.3. Ověření vazebné aktivity IBD proteinu

Rekombinantní IBD, jehož příprava byla jedním z cílů této diplomové práce, byl použit pro studium interakce s rekombinantně připraveným fragmentem PogZ. Preparát IBD připravený dle postupu popsaného v kap. 6.2.2. byl tedy použit k ověření vazebné afinity IBD k interakční doméně na C-konci PogZ (ctPogZ).

Pro potvrzení schopnosti rekombinantně připravených fragmentů proteinů spolu interagovat bylo použito tzv. „pull-down“ stanovení. Při tomto stanovení bylo využito konstruktu ctPogZ-6×H (viz. **Obrázek 5 B**, str. 52), který je opatřen histidinovou kotvou a je možné jej pomocí chelatace navázat na Ni-CAM HC nosič. V případě, že dojde k tvorbě komplexu IBD a ctPogZ-6×H, lze prostřednictvím jejich vzájemné interakce zachytit na nosič i IBD bez histidinové kotvy.

IBD použitý v tomto pokusu se nacházel v pufru o složení 50mM Tris-HCl, pH 7,8 a 150mM NaCl. Protein ctPogZ-6×H v přibližně 95% čistotě se nacházel v pufru o složení 50mM Tris-HCl, pH 8; 150mM NaCl a 0,05% 2-merkapt ethanol. Kromě vzorku, v němž se nacházely oba tyto proteiny, byly jako kontrola připraveny další dva vzorky, které obsahovaly pouze samotný ctPogZ-6×H a samotný IBD.

Podmínky vhodné pro vazbu a postup celého stanovení byly optimalizovány; získaný protokol je uveden výše (viz kap. 5.2.7.). Vzorky získané v průběhu stanovení byly analyzovány prostřednictvím SDS-PAGE (viz **Obrázek 26**, str. 74). Z analýzy vzorků získaných při studiu směsi obsahující oba rekombinantní proteiny vyplývá, že jsou oba tyto proteiny společně uvolněny z nosiče až v prostředí elučního pufru, a tedy že jsou schopné v daném prostředí vytvářet komplex (viz **Obrázek 26**, str. 74; sloupec IBD+ctPogZ-6×H, dráha E). Odpovídající kontrola obsahující pouze ctPogZ-6×H ukázala, že se samotný ctPogZ-6×H za daných podmínek váže na Ni-CAM HC nosič a je z něj uvolněn až v prostředí elučního pufru (viz **Obrázek 26**, str. 74; sloupec IBD, dráha E). Kontrola obsahující pouze IBD ukázala, že se samotný IBD za daných podmínek nespecificky na Ni CAM HC nosič neváže (viz **Obrázek 26**, str. 74; sloupec ctPogZ-6×H, dráha E). Touto metodou bylo ověřeno, že námi připravené rekombinantní proteiny IBD a ctPogZ-6×H spolu interagují.



**Obrázek 26: Analýza vzorků ze stanovování interakce ctPogZ a IBD**

Připravené vzorky (N) byly inkubovány s Ni-CAM HC nosičem. Poté byly centrifugovány; supernatant (FT) byl uschován a k peletě (nosiči) byl po promytí přidán eluční pufr, čímž došlo k uvolnění látek navázaných na nosič (E). Velikost IBD je přibližně 12 kDa a ctPogZ-6xH přibližně 34 kDa. IBD a ctPogZ-6xH se vážou na nosič a jsou společně eluovány až v přítomnosti elučního pufru. Kontrola obsahující pouze IBD ukázala, že se samotný IBD za daných podmínek neváže nespecificky na Ni CAM nosič. Kontrola obsahující pouze ctPogZ-6xH ukázala, že se samotný ctPogZ za daných podmínek váže na Ni-CAM HC nosič a je z něj eluován pomocí elučního pufru.

## 7. DISKUSE

Předmětem našeho zájmu je protein LEDGF/p75 a jeho přirozený buněčný vazebný partner protein PogZ. Naším cílem je připravit kokrystal, který nám umožní získat strukturní informace o jejich vzájemné interakci. Při této strukturní studii není nezbytné pracovat s celými proteiny, které obsahují mnoho domén, a proto jsme se soustředili na přípravu domén zodpovědných za vazbu, tj. IBD proteinu LEDGF/p75 a C-koncovou doménu proteinu PogZ.

Při přípravě proteinů pro krystalizaci je nezbytné získat vzorky o vysoké čistotě, obsahující velké množství proteinu. Během přípravy těchto vzorků je tedy potřeba optimalizovat podmínky všech kroků tak, aby byl výtěžek maximální. Optimalizace se provádí na několika úrovních. Velice důležitá je volba vhodného plasmidového konstruktů, jenž následně zprostředkovává expresi fuzních proteinů nebo proteinů opatřených afinitní kotvou, a též výběr odpovídajícího expresního systému. Dále jsou uzpůsobovány podmínky exprese tak, aby byla maximalizována buď produkce rozpustného proteinu, nebo tvorba inklusních tělísek. V neposlední řadě je nezbytné optimalizovat postup purifikace a uchovávání připravených vzorků.

K rekombinantní expresi proteinů byly jako heterologní expresní systémy použity kmeny *E. coli* BL21(DE3) a *E. coli* Rosetta 2. Při expresi v *E. coli* BL21(DE3) bylo využito indukibilního systému expresních plasmidů pod kontrolou *T7* promotoru (pocházejícího z fága T7) [108]. Při expresi v *E. coli* Rosetta 2 bylo využito indukibilního systému expresních plasmidů pod kontrolou *P<sub>tac</sub>* promotoru. Oba tyto expresní systémy jsou indukovatelné laktosou, IPTG nebo ETG. Kmen *E. coli* Rosetta 2 navíc obsahuje geny pro kodóny tRNA, které se jinak v *E. coli* vyskytují vzácně. Jejich přítomnost způsobuje zvýšení hladiny exprese lidských proteinů [109]. Inducibilní systémy jsou při kultivaci s výhodou využívány proto, že až do provedení indukce je hladina rekombinantně připravovaného proteinu velice nízká, což umožňuje bakteriální kultuře normální růst. Pokud je expresním systémem produkován rekombinantní protein, může dojít po určité době k zastavení růstu a rozmnožování buněk systému. Heterologní protein je totiž exprimován na úkor buněčných proteinů a někdy je dokonce toxický.

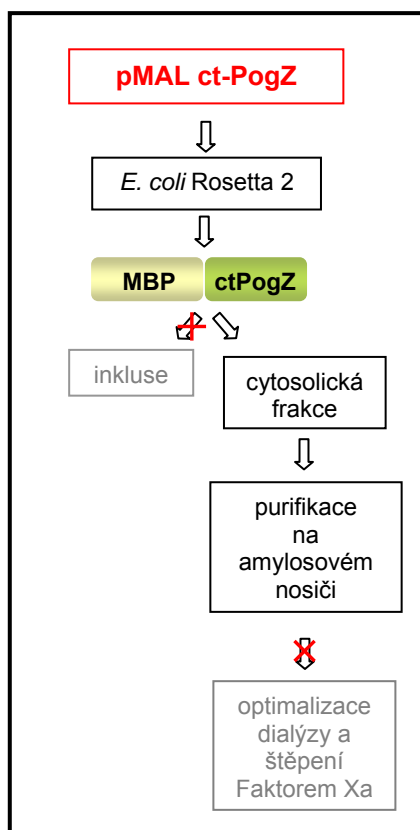
Během rekombinantní exprese jsme pro různé proteinové produkty optimalizovali faktory kultivace bakteriální kultury tak, aby byla maximalizována buď produkce

rozpustného proteinu, či jeho ukládání do inklusních tělísek. Faktory, které se optimalizují, jsou zejména teplota kultivace, ale i množství přidaného induktoru či složení kultivačního média. Pokud je rekombinantní produkt v bakteriálních buňkách produkován v rozpustné formě, lze tuto produkci podpořit např. snížením kultivační teploty nebo množství indukčního činidla.

Prvním přístupem, který jsme zvolili pro rekombinantní expresi dvou vazebných partnerů ctPogZ a IBD, byla jejich příprava ve formě fuzních proteinů. Pro IBD byl, na základě publikovaných výsledků [46], zvolen jako fuzní partner protein GST. Pro ctPogZ bylo využito plasmidu pro expresi fuzního proteinu s MBP, neboť tento plasmid byl úspěšně používán k expresi ve spolupracující laboratoři „Laboratory of Molecular Virology and Gene Therapy, Division of Molecular Medicine“ z Katholieke Universiteit v Leuvenu.

MBP slouží k afinitní purifikaci fuzního produktu na koloně s imobilizovanou amylosou a GST slouží k afinitní purifikaci na Glutathion Sepharose. Kromě toho, že fuze s MBP a GST umožňuje purifikaci a částečné zahuštění, dochází obecně ke zlepšení rozpustnosti proteinu a zvýšení hladiny exprese [97-99], což se při práci s fuzními proteiny potvrdilo. Cílem celého projektu je krystalizace a následná rentgenostrukturní analýza fragmentů IBD a ctPogZ, a proto bylo nezbytné fuzní proteiny po provedení příslušné afinitní chromatografie rozštěpit. Po odštěpení MBP a GST však proteiny ztrácí výhody, které jim fuze poskytovala. Jak jsme pozorovali, po odštěpení fuzního partnera docházelo v obou případech k precipitaci proteinů.

Fuzní protein MBP-ctPogZ připravovaný pomocí výše popsaného plasmidu pMAL ctPogZ (viz kap. 6.1.) byl exprimován v *E. coli* Rosetta 2. Schéma postupu přípravy se nachází na **Obrázku 27** (str. 77). Fuzní protein byl v bakteriálních buňkách při výše uvedených podmínkách produkován ve velkém množství do cytosolu v rozpustné formě a purifikace na amylosovém nosiči byla velice účinná. Při optimalizaci podmínek štěpení fuzního proteinu MBP-ctPogZ Factorem Xa se však ukázalo, že tento protein precipituje a také podléhá proteolýze i v nepřítomnosti faktoru Xa (pravděpodobně působením kontaminujících proteas).

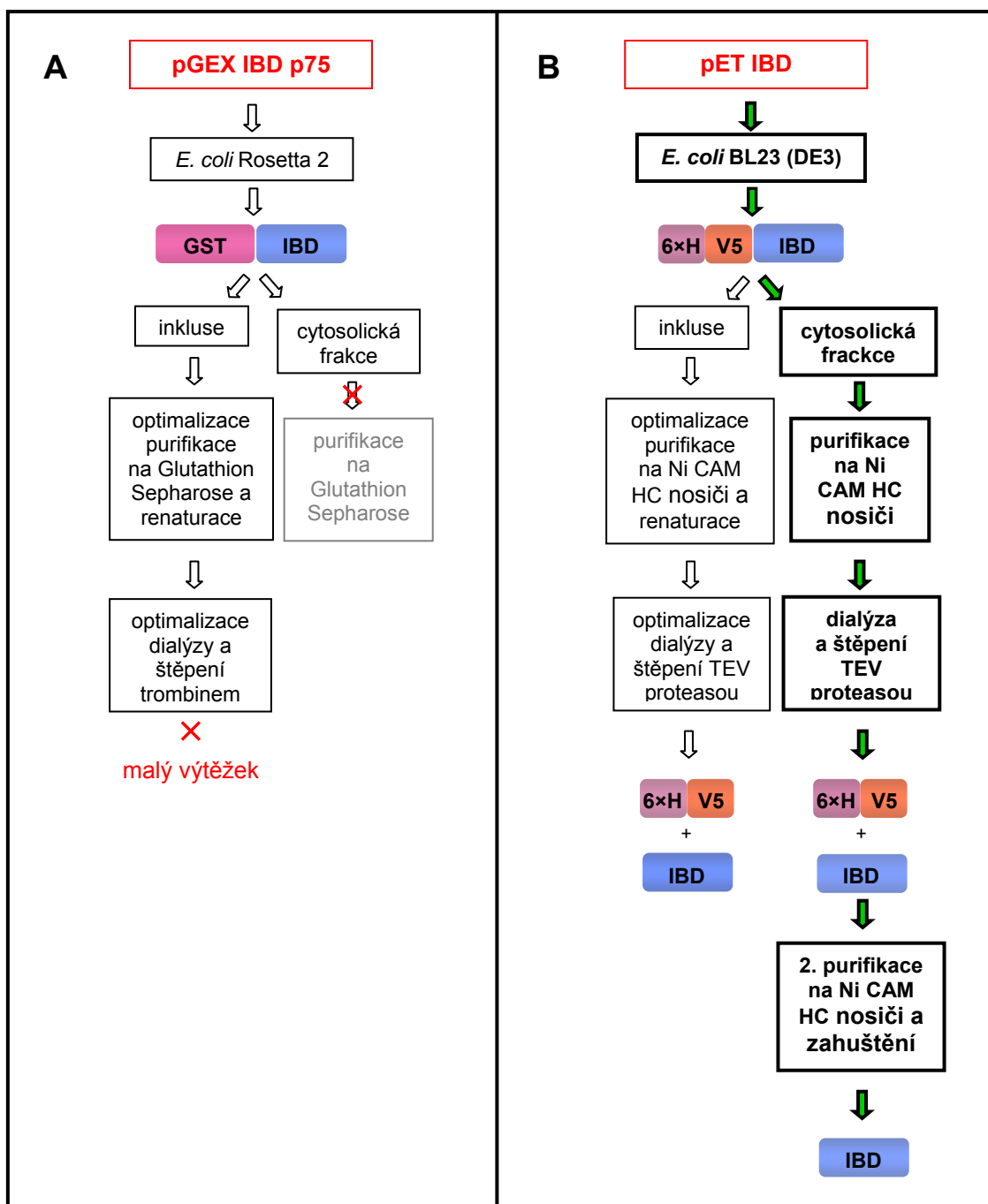


**Obrázek 27: Schématické znázornění postupu při přípravě proteinu ctPogZ**

Transformací *E. coli* Rosetta 2 plasmidem pMAL ctPogZ a následnou expresí, izolací a purifikací se ctPogZ nepodařilo připravit v dostatečném množství a kvalitě.

Od optimalizace purifikace a štěpení MBP-ctPogZ bylo upuštěno, neboť k přípravě ctPogZ byla použita jiná paralelně testovaná expresní strategie (která nebyla součástí této diplomové práce). Protein ctPogZ, obsahující histidinovou kotvu na C-konci (viz **Obrázek 5 B**, str. 52), byl ve školitelské laboratoři připraven v dostatečné čistotě a množství Ing. Kateřinou Procházkovou Ph.D., a při vypracovávání této diplomové práce byl použit k ověření vazebné aktivity IBD.

Hlavním z cílů této diplomové práce byla příprava rekombinantního IBD. Různé strategie přípravy IBD, které byly testovány a optimalizovány, jsou shrnuty na schématu nacházejícím se na **Obrázku 28** (str. 78) a jejich výsledky diskutovány níže.



**Obrázek 28: Schématické znázornění postupu přípravy proteinu IBD**

**A:** Transformací *E. coli* Rosetta 2 plasmidem pGEX IBD p75 a následnou expresí, izolací a purifikací se IBD nepodařilo připravit. **B:** IBD byla získána transformací *E. coli* BL21 (DE3) plasmidem pET IBD. Podařilo se jej izolovat z inkusních tělísek i z cytosolické frakce. Vzhledem k tomu, že protein izolovaný z inkusních tělísek musí být renaturován, hrozí větší riziko neadekvátního poskládání a tvorby nerozpustných agregátů. Proto byla zvolena jako vhodnější cesta přípravy izolace tohoto proteinu z cytosolické frakce.

Fuzní protein GST-IBD připravovaný pomocí výše popsaného plasmidu pGEX IBD p75 (viz kap. 6.2.) byl exprimován v *E. coli* Rosetta 2. Schématické znázornění postupu práce při přípravě IBD touto cestou se nachází na **Obrázku 28 A** (str. 78).

GST-IBD (viz **Obrázek 11 A**, str. 57) byl při výše uvedených podmínkách produkován rozpustný, ale ve větší míře byl ukládán do inkusních tělísek. Pokusy o purifikaci GST-IBD z rozpustné cytosolické frakce byly neúspěšné, a proto byl vypracován protokol pro jeho purifikaci a renaturaci tohoto fuzního proteinu z inkusních tělísek. Štěpení fuzního proteinu poskytlo odpovídající štěpné produkty, avšak po štěpení docházelo k precipitaci IBD proteinu a výsledný výtěžek nebyl dostačující pro interakční a strukturní studie.

Z tohoto důvodu byl připraven další konstrukt pET IBD, jež kódoval protein IBD opatřený na N-konci krátkou extenzí obsahující histidinovou kotvou a V5 epitop (viz **Obrázek 11 B**, str. 57). Tato kotva poskytuje možnost purifikace na Ni-CAM HC nosiči, která bývá velice účinná a zároveň umožňuje detekci proteinu specifickou protilátkou rozpoznávající polyhistidinovou sekvenci. Odštěpení kotvy nepředstavuje tak velký zásah jako odštěpení proteinového fuzního partnera (GST) a případně při problémech s odštěpením může být na rekombinantním proteinu ponechána. Konstrukt byl navržen tak, aby poskytoval protein, v jehož primární struktuře se nacházela sekvence rozpoznávaná TEV proteasou, umožňující následné odštěpení histidinové kotvy. TEV proteasa byla zvolena pro její vysokou specifitu. Na rozdíl od štěpení trombinem nedochází při použití TEV proteasy ke vzniku heterogenit, jejichž výskyt je při krystalizaci proteinů nežádoucí.

Transformací *E. coli* BL21(DE3) plasmidem pET IBD (viz kap. 6.2.) byl pomocí rekombinantní exprese připraven protein 6×H-IBD. Schématické znázornění postupů při přípravě IBD touto cestou se nachází na **Obrázku 28 B** (str. 78). Během kultivace byl 6×H-IBD produkován jak v rozpustné formě, tak ve formě inkusních tělísek. Jelikož zastoupení rekombinantního proteinu v nich bylo velice významné, bylo přistoupeno k izolaci IBD jak z cytosolu bakterií, tak z inklusí.

Po izolaci 6×H-IBD z inklusí byla, obdobně jako při renaturaci fuzního GST-IBD, použita metoda renaturace proteinu na koloně (Ni-CAM HC nosiči). Při izolaci 6×H-IBD z cytosolu byla prvním purifikačním krokem též chelatační chromatografie na Ni-CAM HC nosiči. Byly optimalizovány podmínky štěpení 6×H-IBD TEV proteasou. Oba tyto izolační postupy ve svém výsledku poskytly vzorek obsahující IBD. Vzhledem k tomu, že protein připravený z cytosolické frakce nemusel být renaturován a hrozilo tedy menší

riziko neadekvátního poskládání a tvorby agregátů, byl tento postup vybrán jako optimální pro další přípravu IBD a postup izolace z inkusních tělísek nebyl rozvíjen.

TEV proteasa a odštěpený N-koncový úsek 6×H-IBD (oba nesoucí histidinovou kotvu) byly následně ze vzorku odstraněny pomocí chelatační chromatografie na Ni-CAM HC nosiči. Získaný vzorek obsahující IBD byl dále zahušťován, během čehož docházelo k precipitaci kontaminujících proteinů a tedy další částečné purifikaci. Tímto postupem se podařilo získat dostatečné množství IBD pro pokusnou přípravu komplexu s C-koncovým úsekem proteinu PogZ a též pro přípravu polyklonální protilátky. Interakce IBD a ctPogZ-6×H byla studována vazbou komplexu na Ni-CAM HC nosiči. Byly nalezeny optimální podmínky pro tvorbu komplexu, ve kterých se oba tyto proteiny navázaly na nosič a byly z něj uvolněny v prostředí elučního pufru. Negativní kontroly vyloučily nescifickou interakci IBD s nosičem a potvrdily schopnost ctPogZ-6×H vázat se pomocí histidinové kotvy na nosič (z něhož je uvolněn v prostředí elučního pufru). Tím bylo potvrzeno, že za výše uvedených podmínek dochází ke tvorbě komplexu rekombinantně připravených IBD a ctPogZ-6×H.

Detekce a vizualizace samotného IBD v polyakrylamidovém gelu po provedení SDS-PAGE je velice problematičká. Takto malý protein (82 aminokyselinových zbytků) obsahuje pouze malé množství aminokyselinových zbytků schopných interagovat s barvicími reagensy. Proto byla volena metoda barvení gelů stříbrem, která je oproti použití Coomassie Brilliant Blue R-250 citlivější, nicméně ani tato metoda neposkytovala optimální barvení.

Rekombinantní IBD protein, připravený v této diplomové práci bude v budoucnu mimo jiné použit na přípravu polyklonální protilátky proti IBD, která významně usnadní detekci IBD pomocí WB. Problematické je i spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinu ve vzorku, které je kvůli velikosti proteinu a množství kontaminací zatíženo velkou chybou.

Čistota vzorku IBD, získaného protokolem vypracovaným v této diplomové práci, není dostatečná pro potřeby krystalizace. Tímto postupem lze z 1 litru bakteriální kultury získat přibližně 0,75 mg IBD. Další purifikace bude v budoucnu realizována pomocí gelové chromatografie, která bude prováděna s komplexem tohoto proteinu s ctPogZ-6×H. Naším cílem je získat vzorek obsahující tyto dva proteiny v množství a čistotě dostačujících pro krystalizaci. V budoucnu by měl být připraven kokrytal, který nám umožní získat strukturní informace o vzájemné interakci těchto dvou domén.



## 8. SOUHRN

V následujících bodech jsou shrnuty výsledky této diplomové práce:

- Byla sepsána literární rešerše, zabývající se vlastnostmi, strukturou a funkcí proteinu LEDGF/p75, se zaměřením nejen na jeho úlohu v replikačním cyklu virů rodu *Lentivirae*, ale i na jeho přirozenou buněčnou funkci. Pozornost byla věnována také jeho přirozeným buněčným vazebným partnerům, obzvláště pak proteinu PogZ.
- Pomocí rekombinantní exprese byl připraven fuzní protein MBP-ctPogZ, pro který byl následně vypracován postup izolace z bakteriálního cytosolu a purifikace. Během štěpení vykazoval tento fuzní protein nestabilní chování. Od optimalizace štěpení MBP-ctPogZ bylo upuštěno, neboť mezitím došlo k přípravě ctPogZ použitím jiné paralelně testované expresní strategie (která nebyla součástí této diplomové práce).
- Použitím rekombinantní exprese byl připraven fuzní protein GST-IBD. Byla optimalizována izolace, purifikace a štěpení tohoto fuzního proteinu. Výtěžek tohoto postupu však nebyl dostatečný pro vazebné a strukturní studie.
- Byl připraven alternativní plasmid pro expresi IBD s N-koncovou histidinovou kotvou 6×H-IBD. Fragment DNA kódující vazebnou doménu IBD proteinu LEDGF/p75 byl metodou „klonování bez ligace“ (TOPO<sup>®</sup> klonování) přenesen do pET151/D-TOPO<sup>®</sup> vektoru, který umožnil následnou expresi proteinu.
- Byl vypracován postup exprese, izolace a purifikace proteinu 6×H-IBD a následně optimalizován postup odštěpení histidinové kotvy. Bylo připraveno dostatečné množství IBD, jenž byl zahuštěn a použit ke studiu interakce s ctPogZ.
- Bylo ukázáno, že námi připravené rekombinantní proteiny IBD a ctPogZ spolu interagují.

Optimalizovaný isolační a purifikační protokol přípravy proteinu IBD vypracovaný v rámci této diplomové práce bude dále využit při strukturních studiích zaměřených na osvětlení buněčné úlohy proteinu LEDGF/p75. V širším kontextu tato práce přispívá k vývoji inhibitorů, které by bránily vazbě integrasy viru HIV-1 na LEDGF/p75.

## 9. POUŽITÁ LITERATURA

1. **Llano M., Morrison J. and Poeschla E.M.**, Virological and Cellular Roles of the Transcriptional Coactivator LEDGF/p75, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*; 339, 125-146, (2010)
2. **Maertens G.N., Cherepanov P. and Engelman A.**, Transcriptional co-activator p75 binds and tethers the Myc-interacting protein JPO2 to chromatin, *J. Cell Sci.*; 119, 2563-2571, (2006)
3. **Bartholomeeusen K., Christ F., Hendrix J., Rain J.C., Emiliani S., Benarous R., Debyser Z., Gijssbers R. and De Rijck J.**, Lens epithelium-derived growth factor/p75 interacts with the transposase-derived DDE domain of PogZ, *J. Biol. Chem.*; 284, 11467-11477, (2009)
4. **Yokoyama A. and Cleary M.L.**, Menin critically links MLL proteins with LEDGF on cancer-associated target genes, *Cancer Cell*; 14, 36-46, (2008)
5. **Hughes S., Jenkins V., Dar M.J., Engelman A. and Cherepanov P.**, Transcriptional co-activator LEDGF interacts with Cdc7-activator of S-phase kinase (ASK) and stimulates its enzymatic activity, *J. Biol. Chem.*; 285, 541-554, (2010)
6. **Cherepanov P., Maertens G., Proost P., Devreese B., Van Beeumen J., Engelborghs Y., De Clercq E. and Debyser Z.**, HIV-1 integrase forms stable tetramers and associates with LEDGF/p75 protein in human cells, *J. Biol. Chem.*; 278, 372-381, (2003)
7. **Singh D.P., Ohguro N., Chylack L.T., Jr. and Shinohara T.**, Lens epithelium-derived growth factor: increased resistance to thermal and oxidative stresses, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*; 40, 1444-1451, (1999)
8. **Dietz F., Franken S., Yoshida K., Nakamura H., Kappler J. and Gieselmann V.**, The family of hepatoma-derived growth factor proteins: characterization of a new member HRP-4 and classification of its subfamilies, *Biochem. J.*; 366, 491-500, (2002)
9. **Llano M., Vanegas M., Fregoso O., Saenz D., Chung S., Peretz M. and Poeschla E.M.**, LEDGF/p75 determines cellular trafficking of diverse lentiviral but not murine oncoretroviral integrase proteins and is a component of functional lentiviral preintegration complexes, *J. Virol.*; 78, 9524-9537, (2004)
10. **Maertens G., Cherepanov P., Pluymers W., Busschots K., De Clercq E., Debyser Z. and Engelborghs Y.**, LEDGF/p75 is essential for nuclear and chromosomal targeting of HIV-1 integrase in human cells, *J. Biol. Chem.*; 278, 33528-33539, (2003)

11. **Ge H., Si Y. and Roeder R.G.**, Isolation of cDNAs encoding novel transcription coactivators p52 and p75 reveals an alternate regulatory mechanism of transcriptional activation, *EMBO J.*; 17, 6723-6729, (1998)
12. **Singh D.P., Kimura A., Chylack L.T., Jr. and Shinohara T.**, Lens epithelium-derived growth factor (LEDGF/p75) and p52 are derived from a single gene by alternative splicing, *Gene*; 242, 265-273, (2000)
13. **Llano M., Vanegas M., Hutchins N., Thompson D., Delgado S. and Poeschla E.M.**, Identification and characterization of the chromatin-binding domains of the HIV-1 integrase interactor LEDGF/p75, *J. Mol. Biol.*; 360, 760-773, (2006)
14. **Turlure F., Maertens G., Rahman S., Cherepanov P. and Engelman A.**, A tripartite DNA-binding element, comprised of the nuclear localization signal and two AT-hook motifs, mediates the association of LEDGF/p75 with chromatin in vivo, *Nucleic Acids Res.*; 34, 1653-1665, (2006)
15. **Vanegas M., Llano M., Delgado S., Thompson D., Peretz M. and Poeschla E.**, Identification of the LEDGF/p75 HIV-1 integrase-interaction domain and NLS reveals NLS-independent chromatin tethering, *J. Cell Sci.*; 118, 1733-1743, (2005)
16. **Cherepanov P., Devroe E., Silver P.A. and Engelman A.**, Identification of an evolutionarily conserved domain in human lens epithelium-derived growth factor/transcriptional co-activator p75 (LEDGF/p75) that binds HIV-1 integrase, *J. Biol. Chem.*; 279, 48883-48892, (2004)
17. **Nishizawa Y., Usukura J., Singh D.P., Chylack L.T., Jr. and Shinohara T.**, Spatial and temporal dynamics of two alternatively spliced regulatory factors, lens epithelium-derived growth factor (ledgf/p75) and p52, in the nucleus, *Cell Tissue Res.*; 305, 107-114, (2001)
18. **Singh D.P., Kubo E., Takamura Y., Shinohara T., Kumar A., Chylack L.T., Jr. and Fatma N.**, DNA binding domains and nuclear localization signal of LEDGF: contribution of two helix-turn-helix (HTH)-like domains and a stretch of 58 amino acids of the N-terminal to the trans-activation potential of LEDGF, *J. Mol. Biol.*; 355, 379-394, (2006)
19. **Bartholomeeusen K., De Rijck J., Busschots K., Desender L., Gijsbers R., Emiliani S., Benarous R., Debyser Z. and Christ F.**, Differential interaction of HIV-1 integrase and JPO2 with the C terminus of LEDGF/p75, *J. Mol. Biol.*; 372, 407-421, (2007)
20. **Shun M.C., Raghavendra N.K., Vandegraaff N., Daigle J.E., Hughes S., Kellam P., Cherepanov P. and Engelman A.**, LEDGF/p75 functions downstream from preintegration complex formation to effect gene-specific HIV-1 integration, *Genes Dev.*; 21, 1767-1778, (2007)

21. **Vandekerckhove L., Christ F., Van Maele B., De Rijck J., Gijsbers R., Van den Haute C., Witvrouw M. and Debyser Z.**, Transient and stable knockdown of the integrase cofactor LEDGF/p75 reveals its role in the replication cycle of human immunodeficiency virus, *J. Virol.*; 80, 1886-1896, (2006)
22. **Fatma N., Kubo E., Chylack L.T., Jr., Shinohara T., Akagi Y. and Singh D.P.**, LEDGF regulation of alcohol and aldehyde dehydrogenases in lens epithelial cells: stimulation of retinoic acid production and protection from ethanol toxicity, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*; 287, C508-516, (2004)
23. **Fatma N., Kubo E., Sharma P., Beier D.R. and Singh D.P.**, Impaired homeostasis and phenotypic abnormalities in Prdx6<sup>-/-</sup> mice lens epithelial cells by reactive oxygen species: increased expression and activation of TGFβ, *Cell Death Differ.*; 12, 734-750, (2005)
24. **Fatma N., Singh D.P., Shinohara T. and Chylack L.T., Jr.**, Transcriptional regulation of the antioxidant protein 2 gene, a thiol-specific antioxidant, by lens epithelium-derived growth factor to protect cells from oxidative stress, *J. Biol. Chem.*; 276, 48899-48907, (2001)
25. **Kubo E., Fatma N., Sharma P., Shinohara T., Chylack L.T., Jr., Akagi Y. and Singh D.P.**, Transactivation of involucrin, a marker of differentiation in keratinocytes, by lens epithelium-derived growth factor (LEDGF), *J. Mol. Biol.*; 320, 1053-1063, (2002)
26. **Matsui H., Lin L.R., Singh D.P., Shinohara T. and Reddy V.N.**, Lens epithelium-derived growth factor: increased survival and decreased DNA breakage of human RPE cells induced by oxidative stress, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*; 42, 2935-2941, (2001)
27. **Sharma P., Singh D.P., Fatma N., Chylack L.T., Jr. and Shinohara T.**, Activation of LEDGF gene by thermal-and oxidative-stresses, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 276, 1320-1324, (2000)
28. **Shinohara T., Singh D.P. and Fatma N.**, LEDGF, a survival factor, activates stress-related genes, *Prog. Retin. Eye Res.*; 21, 341-358, (2002)
29. **Takamura Y., Fatma N., Kubo E. and Singh D.P.**, Regulation of heavy subunit chain of gamma-glutamylcysteine synthetase by tumor necrosis factor-α in lens epithelial cells: role of LEDGF/p75, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*; 290, C554-566, (2006)
30. **Singh D.P., Fatma N., Kimura A., Chylack L.T., Jr. and Shinohara T.**, LEDGF binds to heat shock and stress-related element to activate the expression of stress-related genes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 283, 943-955, (2001)

31. **Huang T.S., Myklebust L.M., Kjarland E., Gjertsen B.T., Pendino F., Bruserud O., Doskeland S.O. and Lillehaug J.R.,** LEDGF/p75 has increased expression in blasts from chemotherapy-resistant human acute myelogenic leukemia patients and protects leukemia cells from apoptosis in vitro, *Mol. Cancer*; 6, 31, (2007)
32. **Machida S., Chaudhry P., Shinohara T., Singh D.P., Reddy V.N., Chylack L.T., Jr., Sieving P.A. and Bush R.A.,** Lens epithelium-derived growth factor promotes photoreceptor survival in light-damaged and RCS rats, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*; 42, 1087-1095, (2001)
33. **Nakamura M., Singh D.P., Kubo E., Chylack L.T., Jr. and Shinohara T.,** LEDGF: survival of embryonic chick retinal photoreceptor cells, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*; 41, 1168-1175, (2000)
34. **Singh D.P., Ohguro N., Kikuchi T., Sueno T., Reddy V.N., Yuge K., Chylack L.T., Jr. and Shinohara T.,** Lens epithelium-derived growth factor: effects on growth and survival of lens epithelial cells, keratinocytes, and fibroblasts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 267, 373-381, (2000)
35. **Wu X., Daniels T., Molinaro C., Lilly M.B. and Casiano C.A.,** Caspase cleavage of the nuclear autoantigen LEDGF/p75 abrogates its pro-survival function: implications for autoimmunity in atopic disorders, *Cell Death Differ.*; 9, 915-925, (2002)
36. **Brown-Bryan T.A., Leoh L.S., Ganapathy V., Pacheco F.J., Mediavilla-Varela M., Filippova M., Linkhart T.A., Gijssbers R., Debyser Z. and Casiano C.A.,** Alternative splicing and caspase-mediated cleavage generate antagonistic variants of the stress oncoprotein LEDGF/p75, *Mol. Cancer Res.*; 6, 1293-1307, (2008)
37. **Daugaard M., Kirkegaard-Sorensen T., Ostenfeld M.S., Aaboe M., Hoyer-Hansen M., Orntoft T.F., Rohde M. and Jaattela M.,** Lens epithelium-derived growth factor is an Hsp70-2 regulated guardian of lysosomal stability in human cancer, *Cancer Res.*; 67, 2559-2567, (2007)
38. **Ganapathy V. and Casiano C.A.,** Autoimmunity to the nuclear autoantigen DFS70 (LEDGF): what exactly are the autoantibodies trying to tell us?, *Arthritis Rheum.*; 50, 684-688, (2004)
39. **Ganapathy V., Daniels T. and Casiano C.A.,** LEDGF/p75: a novel nuclear autoantigen at the crossroads of cell survival and apoptosis, *Autoimmun. Rev.*; 2, 290-297, (2003)
40. **Ochs R.L., Muro Y., Si Y., Ge H., Chan E.K. and Tan E.M.,** Autoantibodies to DFS 70 kd/transcription coactivator p75 in atopic dermatitis and other conditions, *J. Allergy Clin. Immunol.*; 105, 1211-1220, (2000)

41. **Muro Y., Sugiura K., Morita Y. and Tomita Y.**, High concomitance of disease marker autoantibodies in anti-DFS70/LEDGF autoantibody-positive patients with autoimmune rheumatic disease, *Lupus*; 17, 171-176, (2008)
42. **Ogawa Y., Sugiura K., Watanabe A., Kunimatsu M., Mishima M., Tomita Y. and Muro Y.**, Autoantigenicity of DFS70 is restricted to the conformational epitope of C-terminal alpha-helical domain, *J. Autoimmun.*; 23, 221-231, (2004)
43. **Emiliani S., Mousnier A., Busschots K., Maroun M., Van Maele B., Tempe D., Vandekerckhove L., Moisan F., Ben-Slama L., Witvrouw M., Christ F., Rain J.C., Dargemont C., Debyser Z. and Benarous R.**, Integrase mutants defective for interaction with LEDGF/p75 are impaired in chromosome tethering and HIV-1 replication, *J. Biol. Chem.*; 280, 25517-25523, (2005)
44. **Llano M., Saenz D.T., Meehan A., Wongthida P., Peretz M., Walker W.H., Teo W. and Poeschla E.M.**, An essential role for LEDGF/p75 in HIV integration, *Science*; 314, 461-464, (2006)
45. **Busschots K., Voet A., De Maeyer M., Rain J.C., Emiliani S., Benarous R., Desender L., Debyser Z. and Christ F.**, Identification of the LEDGF/p75 binding site in HIV-1 integrase, *J. Mol. Biol.*; 365, 1480-1492, (2007)
46. **Cherepanov P., Ambrosio A.L., Rahman S., Ellenberger T. and Engelman A.**, Structural basis for the recognition between HIV-1 integrase and transcriptional coactivator p75, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*; 102, 17308-17313, (2005)
47. **Busschots K., Vercammen J., Emiliani S., Benarous R., Engelborghs Y., Christ F. and Debyser Z.**, The interaction of LEDGF/p75 with integrase is lentivirus-specific and promotes DNA binding, *J. Biol. Chem.*; 280, 17841-17847, (2005)
48. **Cherepanov P.**, LEDGF/p75 interacts with divergent lentiviral integrases and modulates their enzymatic activity in vitro, *Nucleic Acids Res.*; 35, 113-124, (2007)
49. **Craigie R.**, HIV integrase, a brief overview from chemistry to therapeutics, *J. Biol. Chem.*; 276, 23213-23216, (2001)
50. **Engelman A. and Craigie R.**, Identification of conserved amino acid residues critical for human immunodeficiency virus type 1 integrase function in vitro, *J. Virol.*; 66, 6361-6369, (1992)
51. **Asante-Appiah E. and Skalka A.M.**, HIV-1 integrase: structural organization, conformational changes, and catalysis, *Adv. Virus. Res.*; 52, 351-369, (1999)

52. **McColl D.J. and Chen X.**, Strand transfer inhibitors of HIV-1 integrase: bringing IN a new era of antiretroviral therapy, *Antiviral Res.*; 85, 101-118, (2010)
53. **Bushman F.D. and Craigie R.**, Activities of human immunodeficiency virus (HIV) integration protein in vitro: specific cleavage and integration of HIV DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*; 88, 1339-1343, (1991)
54. **Chow S.A., Vincent K.A., Ellison V. and Brown P.O.**, Reversal of integration and DNA splicing mediated by integrase of human immunodeficiency virus, *Science*; 255, 723-726, (1992)
55. **Ciuffi A. and Bushman F.D.**, Retroviral DNA integration: HIV and the role of LEDGF/p75, *Trends. Genet.*; 22, 388-395, (2006)
56. **Ciuffi A., Llano M., Poeschla E., Hoffmann C., Leipzig J., Shinn P., Ecker J.R. and Bushman F.**, A role for LEDGF/p75 in targeting HIV DNA integration, *Nat. Med.*; 11, 1287-1289, (2005)
57. **Marshall H.M., Ronen K., Berry C., Llano M., Sutherland H., Saenz D., Bickmore W., Poeschla E. and Bushman F.D.**, Role of PSIP1/LEDGF/p75 in lentiviral infectivity and integration targeting, *PLoS One*; 2, e1340, (2007)
58. **Hare S., Gupta S.S., Valkov E., Engelman A. and Cherepanov P.**, Retroviral intasome assembly and inhibition of DNA strand transfer, *Nature*, (2010)
59. **Hare S., Di Nunzio F., Labeja A., Wang J., Engelman A. and Cherepanov P.**, Structural basis for functional tetramerization of lentiviral integrase, *PLoS Pathog.*; 5, e1000515, (2009)
60. **Cherepanov P., Sun Z.Y., Rahman S., Maertens G., Wagner G. and Engelman A.**, Solution structure of the HIV-1 integrase-binding domain in LEDGF/p75, *Nat. Struct. Mol. Biol.*; 12, 526-532, (2005)
61. **Busschots K., De Rijck J., Christ F. and Debyser Z.**, In search of small molecules blocking interactions between HIV proteins and intracellular cofactors, *Mol. Biosyst.*; 5, 21-31, (2009)
62. **DeLano W.L.**, The PyMOL Molecular graphic system, *DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA* (2002)
63. RSCB, Protein Danta Bank; An Information Portal to Biological Macromolecular Structures. Webová adresa:  
<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2B4J>

64. **Caslini C., Yang Z., El-Osta M., Milne T.A., Slany R.K. and Hess J.L.**, Interaction of MLL amino terminal sequences with menin is required for transformation, *Cancer Res.*; 67, 7275-7283, (2007)
65. **Hess J.L.**, Mechanisms of transformation by MLL, *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*; 14, 235-254, (2004)
66. **Chen K., Ou X.M., Chen G., Choi S.H. and Shih J.C.**, R1, a novel repressor of the human monoamine oxidase A, *J. Biol. Chem.*; 280, 11552-11559, (2005)
67. **Gunther M., Laithier M. and Brison O.**, A set of proteins interacting with transcription factor Sp1 identified in a two-hybrid screening, *Mol. Cell. Biochem.*; 210, 131-142, (2000)
68. **Marchler-Bauer A., Panchenko A.R., Shoemaker B.A., Thiessen P.A., Geer L.Y. and Bryant S.H.**, CDD: a database of conserved domain alignments with links to domain three-dimensional structure, *Nucleic Acids Res.*; 30, 281-283, (2002)
69. **Namgoong S.Y. and Harshey R.M.**, The same two monomers within a MuA tetramer provide the DDE domains for the strand cleavage and strand transfer steps of transposition, *EMBO J.*; 17, 3775-3785, (1998)
70. **Plasterk R.H.**, The HIV integrase catalytic core, *Nat. Struct. Biol.*; 2, 87-90, (1995)
71. **Allingham J.S., Pribil P.A. and Haniford D.B.**, All three residues of the Tn 10 transposase DDE catalytic triad function in divalent metal ion binding, *J. Mol. Biol.*; 289, 1195-1206, (1999)
72. **Roberts R.J.**, Restriction and modification enzymes and their recognition sequences, *Nucleic Acids Res.*; 10, 117-144, (1982)
73. **Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G. and Erlich H.**, Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*; 51 Pt 1, 263-273, (1986)
74. **Lundberg K.S., Shoemaker D.D., Adams M.W., Short J.M., Sorge J.A. and Mathur E.J.**, High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*, *Gene*; 108, 1-6, (1991)
75. MBI Fermentas: *Pfu* polymerase®. Protocols & recommendations, Fermentas life sciences handbook. Webová adresa: [http://www.fermentas.com/templates/files/tiny\\_mce/coa\\_pdf/coa\\_ep0501.pdf](http://www.fermentas.com/templates/files/tiny_mce/coa_pdf/coa_ep0501.pdf), (staženo dne 24. 1. 2010)



76. Invitrogen™: TOPO TA Cloning® User Manual. Invitrogen Manuals & Documents. Webová adresa: [http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/topota\\_man.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/topota_man.pdf), (staženo dne 2. 1. 2010)
77. **Panja S., Aich P., Jana B. and Basu T.**, How does plasmid DNA penetrate cell membranes in artificial transformation process of *Escherichia coli*?, *Mol. Membr. Biol.*; 25, 411-422, (2008)
78. QIAGEN: QIAprep® Miniprep Handbook. Sample & Assay Technologies, QIAGEN Handbooks & Protocols. Webová adresa: <http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/literature.aspx?id=1000248>, (staženo dne 14. 1. 2010)
79. **Hartley D.L. and Kane J.F.**, Properties of inclusion bodies from recombinant *Escherichia coli*, *Biochem. Soc. Trans.*; 16, 101-102, (1988)
80. **Schein C.H.**, Solubility as a function of protein structure and solvent components, *Biotechnology (N Y)*; 8, 308-317, (1990)
81. **Mitraki A. and King J.**, Protein Folding Intermediates and Inclusion Body Formation, *Nat. Biotech.*; 7, 690-697, (1989)
82. **Rudolph R.**, Successful protein folding on an industrial scale. In *Protein Engineering: Principles and Practices*, John Wiley & Sons, New York (1995)
83. **Taylor G., Hoare M., Cray D.R. and Marston F.A.O.**, Size and density of protein inclusion bodies, *Bio/Technology* 4, 553-557, (1986)
84. **Serwer P.**, Electrophoresis of duplex deoxyribonucleic acid in multiple-concentration agarose gels: fractionation of molecules with molecular weights between  $2 \times 10^6$  and  $110 \times 10^6$ , *Biochemistry*; 19, 3001-3004, (1980)
85. **Sharp P.A., Sugden B. and Sambrook J.**, Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis, *Biochemistry*; 12, 3055-3063, (1973)
86. **Shapiro A.L., Vinuela E. and Maizel J.V., Jr.**, Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 28, 815-820, (1967)
87. **Laemmli U.K.**, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*; 227, 680-685, (1970)
88. **Gorg A., Postel W. and Westermeier R.**, Ultrathin-layer isoelectric focusing in polyacrylamide gels on cellophane, *Anal. Biochem.*; 89, 60-70, (1978)

89. **Merril C.R.**, Gel-staining techniques, *Methods Enzymol.*; 182, 477-488, (1990)
90. **Oakley B.R., Kirsch D.R. and Morris N.R.**, A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels, *Anal Biochem.*; 105, 361-363, (1980)
91. **Mayer J.W.**, Simple and rapid methods for drying polyacrylamide gels after isoelectric focusing, *Anal. Biochem.*; 76, 369-373, (1976)
92. **Towbin H., Staehelin T. and Gordon J.**, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*; 76, 4350-4354, (1979)
93. **Blake M.S., Johnston K.H., Russell-Jones G.J. and Gotschlich E.C.**, A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots, *Anal. Biochem.*; 136, 175-179, (1984)
94. **Laing P.**, Luminescent visualization of antigens on blots, *J. Immunol. Methods*; 92, 161-165, (1986)
95. **Renart J., Reiser J. and Stark G.R.**, Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*; 76, 3116-3120, (1979)
96. **Salinovich O. and Montelaro R.C.**, Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, *Anal. Biochem.*; 156, 341-347, (1986)
97. **Riggs P.**, Expression and purification of recombinant proteins by fusion to maltose-binding protein, *Mol. Biotechnol.*; 15, 51-63, (2000)
98. **Smith D.B. and Johnson K.S.**, Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase, *Gene*; 67, 31-40, (1988)
99. **Waugh D.S.**, Making the most of affinity tags, *Trends Biotechnol.*; 23, 316-320, (2005)
100. **Yip T.T., Nakagawa Y. and Porath J.**, Evaluation of the interaction of peptides with Cu(II), Ni(II), and Zn(II) by high-performance immobilized metal ion affinity chromatography, *Anal. Biochem.*; 183, 159-171, (1989)
101. **Whitaker J.R. and Granum P.E.**, An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280 nm, *Anal. Biochem.*; 109, 156-159, (1980)

102. ExPASy Proteomics Server, Swiss Institute of Bioinformatics. Webová adresa: <http://www.expasy.ch/>
103. **Scott K. and Hughes R.** (1996) Industrial membrane separation technology, Springer.
104. Millipore: Microcon®. Centrifugal filter devices user guide, data sheet. Webová adresa: [http://www.millipore.com/publications.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/962a1b2daa713f34852568f90063d733/\\$FILE/P185.pdf](http://www.millipore.com/publications.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/962a1b2daa713f34852568f90063d733/$FILE/P185.pdf), (staženo dne 17. 2. 2010)
105. Millipore: Amicon®Ultra. Centrifugal filter devices user guide, data sheet. Webová adresa: <http://www.blossombio.com.tw/PDF/Products/Amicon%20Ultra-15.pdf>, (staženo dne 17. 2. 2010)
106. **Edman P.**, A method for the determination of amino acid sequence in peptides, *Arch. Biochem.*; 22, 475, (1949)
107. **Matsudaira P.**, Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes, *J. Biol. Chem.*; 262, 10035-10038, (1987)
108. **Studier F.W. and Moffatt B.A.**, Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes, *J. Mol. Biol.*; 189, 113-130, (1986)
109. Novagen: User Protocol TB009 Rev. G 0609; Competent Cells. Webová adresa: [http://www.merck-chemicals.cz/chemdat/cs\\_CZ/Merck-CZ-Site/EUR/ViewProductDocuments-File?ProductSKU=EMD\\_BIO-71402&DocumentType=TI&DocumentId=200909.449.ProNet&DocumentSource=PRONET](http://www.merck-chemicals.cz/chemdat/cs_CZ/Merck-CZ-Site/EUR/ViewProductDocuments-File?ProductSKU=EMD_BIO-71402&DocumentType=TI&DocumentId=200909.449.ProNet&DocumentSource=PRONET), (staženo dne 17. 4. 2010)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

[illegible]

